

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

MICHEL MACHEBŒUF

(1900-1953)

Evoquer la personne et l'œuvre de Michel Machebœuf est pour moi infiniment douloureux. Je veux cependant apporter à sa mémoire l'hommage d'une amitié de trente-trois années et le témoignage que, dans une vie trop brève, il a bien servi la science.

Le 19 octobre 1900, Michel Machebœuf naît à Châtelguyon, où son père exerce la Médecine. Le Dr Elie Machebœuf disparaît prématurément et l'enfant reste sous la direction affectueuse de sa mère. Michel fait au Lycée de Clermont-Ferrand des études brillamment couronnées en 1917 par deux premiers prix au concours général.

En 1918, Michel Machebœuf s'engage, témoignage d'un courage réfléchi dont il donnera tant d'autres preuves. Stagiaire à la Tour Eiffel comme opérateur-radio, il capte, le 11 novembre, le message annonçant la signature de l'Armistice.

Son incorporation n'ayant plus de raison d'être, il aborde l'étude de la Médecine et l'étude supérieure des Sciences. A l'Université de Clermont-Ferrand, ses Maîtres pressentent déjà

en lui un futur maître. Dès l'année scolaire 1919-1920, il devient externe des Hôpitaux de Paris, il sera docteur en médecine en 1927 après soutenance d'une thèse « sur les composés phosphorés du sang normal ». Licencié ès sciences en 1920, il acquiert d'autres certificats, non par goût immodéré des diplômes, mais pour donner libre cours à sa curiosité d'esprit et grâce à sa rare aptitude à tout assimiler dans le domaine des sciences. C'est à l'occasion de ses premières études de Chimie biologique que j'apprends à estimer ce grand et vigoureux garçon, sympathique, intelligent et laborieux.

Le professeur Gabriel Bertrand l'attache à son service comme préparateur et l'associe à ses recherches sur le nickel et le cobalt chez les êtres vivants. En 1925, grâce à une bourse Rockefeller, Macheboeuf se rend à Copenhague et collabore avec le professeur et M^{me} Sørensen à un travail sur la présence de phosphore dans l'ovalbumine cristallisée. En 1927, il fait un stage de micro-analyse à Strasbourg chez le professeur Nicloux. Auprès de ces Maîtres, il s'initie aux fines méthodes de la biochimie et c'est à cette science qu'il consacrera désormais l'effort de son intelligence et sa passion de la recherche.

Il s'attache à des travaux « sur les stérols, lipides et protides du sérum et du plasma sanguins », dont il fait l'objet de sa thèse de doctorat ès sciences (1928) et qui marqueront profondément dans sa carrière. L'année suivante, il est inscrit sur la liste d'aptitude aux fonctions de Maître de Conférences et se voit confier par Em. Roux et Alb. Calmette un laboratoire d'études chimiques sur le bacille tuberculeux. Jamais son enthousiasme pour le travail ne fut plus grand. Le voilà avec un service à sa mesure. Il le crée avec méthode et passion, assisté par de jeunes chercheurs qu'il anime de sa lucide intelligence. En un domaine déjà exploré par des Maîtres, il fait des découvertes de grand prix. Malheureusement, sept années de manipulations parfois dangereuses ont grandement affecté sa santé. Il est contraint de quitter un service où il a tant donné de lui-même, un Institut auquel il a voué un attachement profond, des Maîtres qu'il vénère.

En 1930, candidat à l'Agrégation des Facultés de Médecine (Chimie médicale), il arrive en tête de liste. Agrégé à Lille (près du professeur Polonovski), il ne fait qu'y passer, car il devient, à Bordeaux, titulaire de la chaire de Chimie biologique et médicale, illustrée par G. Denigès et trop peu d'années occupée par H. Delaunay. En peu de mois, il dote le laboratoire d'appareils modernes. Avec ses collaborateurs, il est en liaison permanente, manipule au milieu d'eux, leur donne l'exemple, les conseille et encourage. Douze thèses, une trentaine de notes témoignent de l'activité du Patron et des élèves. Les événements

de 1939 orientent l'effort commun vers des questions intéressant la Défense nationale et le ravitaillement.

Dès 1942, Macheboeuf est appelé par M. Tréfouël à assurer la direction du Laboratoire de Chimie biologique de l'Institut Pasteur, assumée jusqu'alors par le professeur G. Bertrand. Lourde tâche que celle de maintenir l'incomparable éclat de ce service et d'engager la recherche dans des voies neuves. Au milieu des difficultés que créent la deuxième guerre mondiale et ses lendemains et malgré d'autres obligations, qu'en ces temps douloureux, il consent à assumer, il répond, par l'originalité et la diversité de ses travaux, à ce que l'on attend de lui.

Il eût été dommage que Macheboeuf n'eût plus occasion de transmettre à des auditoires d'étudiants ses connaissances, ses vues personnelles, de susciter des ambitions désintéressées, d'orienter vers d'utiles applications de la biochimie. Grâce à l'initiative de l'Institut Pasteur, bien accueillie par la Faculté des Sciences, il devient Maître de Conférences de Chimie micro-biologique appliquée (mars 1950). Professeur sans chaire en janvier 1951, il est présenté en avril 1953 pour un poste de professeur à titre personnel.

★★

Il nous faut maintenant qualifier sa vie scientifique, à larges traits, car nous ne saurions rendre compte de 300 publications. Il oriente surtout ses investigations et celles de ses collaborateurs (1) vers l'étude du plasma et du sérum sanguins et celle des micro-organismes pathogènes.

Une première observation aboutit à isoler du sérum l'acide diphospho-*l*-glycérique. Une seconde, de particulière importance, le conduit à concevoir l'existence de véritables associations lipides-protéides, en lesquelles s'estompent les propriétés des constituants. Encore en fallait-il apporter une démonstration décisive. Il isole du sérum de cheval une substance définie, renfermant 23 p. 100 d'une lécithine, 18 p. 100 d'esters de cholestérol, 59 p. 100 de protéides, donnant des solutions aqueuses limpides. Protéides et lipides intimement liés ne se séparent pas à l'électrophorèse. Macheboeuf appelle ces associations *cénapses*, mot aujourd'hui universellement employé, comme est universellement admis le concept qu'il recouvre. Les *cénapses* lipido-protéiques sont des constituants fondamentaux des plasmas et des cytoplasmes.

Macheboeuf tente d'expliquer les faits à la lumière des conceptions de Langmuir sur l'affinité réciproque des groupements chimiques de configuration semblable et l'expérience confirme pleinement ses vues. Pourrait-on réaliser une « synthèse de *cénapses* lipido-protéiques » ? se dit-il aussi. Une solution aqueuse d'acides gras dans des acides

(1) Dont nous ne pouvons, en ce texte condensé, citer les noms.

biliaires est mélangée avec une solution protéique. On dialyse. Les acides gras restent en solution à l'état de cénapses hydro-solubles stables. La réalisation d'une cénapse est acquise. Tout cela est conduit avec méthode, de l'isolement de la première cénapse naturelle à l'obtention de la première cénapse artificielle ; on admire cette exigence continue de l'esprit, que l'hypothèse alimente et que satisfait seule l'évidence des faits. L'étude du plasma de malades atteints de néphrose lipoidique lui permet d'étudier les propriétés des cénapses, leur intervention dans les échanges entre sang et tissus, leur rôle dans les phénomènes d'immunité.

Machebœuf et ses collaborateurs ont travaillé sur les protéines elles-mêmes : stabilité, affinité chimique, renouvellement. Grâce à l'emploi des isotopes ^{13}C et ^{14}C et d'une technique originale (valine marquée dans sa partie isopropyle) ils déterminent la *vitesse de renouvellement des protéines plasmatiques*. Les courbes de décroissance de l'abondance isotopique sont parfaitement exponentielles ; la vitesse de renouvellement est constante. La même méthode permet d'obtenir sur les anticorps d'intéressantes données. Injectés à l'animal (immunité passive), ils sont désintégrés, mais non remplacés par des molécules identiques. Pour que le remplacement ait lieu, il faut que l'animal ait reçu l'antigène (immunité acquise). L'animal en cours d'immunisation réalise ses anticorps par synthèse.

Les recherches de Machebœuf sur le *bacille tuberculeux* ne sont pas de moindre qualité. De bacilles morts, il extrait les lipides, qu'il fractionne, travail laborieux, et isole la substance qui confère aux extraits alcooliques de bacilles la propriété de fixer l'alexine en présence de sérum de tuberculeux. L'haptène est un mélange d'acides phosphatidiques, constitués par des polyols et de l'acide glycéro-phosphorique à fonctions alcool estérifiées par des acides gras. Chez les bacilles vivants, l'haptène doit être à l'état de cénapse. A partir de ces bacilles, Machebœuf obtient effectivement des solutions renfermant des cénapses qui comportent l'haptène et possèdent des propriétés antigéniques. Mais l'activité antigénique est masquée par des substances phagocyto-toxiques. Or, on peut enlever la majeure partie de celles-ci et laisser en place les antigènes actifs. Machebœuf peut alors traiter les bacilles de telle sorte qu'ils deviennent de puissants antigènes, confèrent aux lapins et cobayes une manifeste résistance à l'infection tuberculeuse. Malheureusement la persistance dans le bacille de tuberculine et de substances toxiques ne permet pas d'envisager leur emploi dans la vaccination humaine. Mais le travail établit que la lutte entre bacille et animal met en œuvre des processus immunitaires. Les bacilles de la diphtérie et de la lèpre possèdent aussi un haptène lipoidique de fixation de l'alexine.

Les travaux sur les *ultra-pressions* résultent du raisonnement suivant. Lorsque l'on prépare un vaccin (chauffage, antiseptique), on risque de dénaturer certains antigènes. Tuer les bactéries par compression au moyen des puissantes presses de M. James Basset serait avantageux. Après des essais décevants (les antigènes étaient

modifiés par une pression élevée), les auteurs obtiennent des vaccins actifs (résultats particulièrement favorables sur les Salmonelles avec des pressions relativement basses). D'autres faits sont rassemblés : les spores résistent à 25 000 kg/cm². Virus et bactériophages, plus facilement inactivés que les bactéries, résistent cependant à 2 500 kg/cm². Enzymes et toxines sont beaucoup plus résistants que les formes végétatives des bactéries, mais moins que les spores. Les toxines ultra-pressées ne se transforment pas en anatoxines et la spécificité antigénique des sérums est modifiée. Les cellules des animaux supérieurs sont plus sensibles à la compression que les virus ; de même, les cellules des tissus cancéreux. Il en résulte que les tumeurs malignes transmissibles par greffe sont inactivées lorsque le greffon a subi une pression de 2 000 kg/cm², alors que, pour les tumeurs transmissibles par filtrat (sarcome de Rous, papillome de Shope), le matériel cellulaire demeure infectieux.

Quand Machebœuf entreprit ses travaux sur les antibiotiques (1946), on ne proposait aucune interprétation de leur mode d'action. Celui-ci doit consister en une influence directe sur quelque système enzymatique en jeu dans une réaction essentielle. Cette hypothèse à l'esprit, Machebœuf explore le mode d'action de la *pénicilline* sur *Clostridium sporogenes*. Aucune étape du catabolisme du glucose n'est touchée ; les premières étapes du catabolisme protéique ne le sont pas davantage. La première action observée porte sur la désamination couplée des amino-acides par réaction type Stickland. Mais c'est là une voie particulière. Machebœuf découvre alors que l'antibiotique agit sur un métabolisme général, celui des nucléotides. Le point sensible se situe au niveau de la liaison ribose-base. La pénicilline agit bien sur un processus enzymatique. Elle trouble ce processus fondamental du catabolisme protéique : la scission des nucléotides par phosphorylation. La streptomycine agit sur d'autres étapes du même métabolisme ; la *tyrothrycine* intervient sur le métabolisme glucidique en bloquant la formation d'acétyl-phosphate à partir de l'acide pyruvique. Chaque antibiotique a son processus d'action.

A bien d'autres sujets, Machebœuf a apporté d'importantes contributions : séparation de protéides de divers milieux, dénaturation et gélification, réactivité, combinaisons cupriques, pouvoir réducteur, hydrolyse sous pression, amino-acides ; rôle solubilisant des acides biliaires ; problèmes divers concernant les conserves alimentaires et les aliments de remplacement. Tant de travaux l'ont conduit à perfectionner maintes techniques : microdosages du phosphore, du cholestérol, des protéines ; microélectrophorèse ; microchromatographie sur papier (applications à alcaloïdes, acides organiques, amino-acides) ; délipidation des cénapses par des saponiums ; hémolyse par les savons à cation actif, etc.

★
★★

Je veux évoquer maintenant le professeur, le citoyen, l'homme. Machebœuf était magnifiquement doué pour l'enseignement : pensée claire et parole aisée. Une mémoire exceptionnelle lui

suggérait des rapprochements imprévus. Il captait l'attention des auditeurs, leur apportait des informations parfaitement à jour et des suggestions ingénieuses, suscitait en eux le désir de connaître, de chercher par eux-mêmes ; il était un éveilléur de vocations. En cela, il était pleinement professeur. Ce sont ces mêmes qualités que l'on retrouve dans les ouvrages auxquels il a donné son concours, tels les *Traité*s et *Exposés* annuels publiés sous la direction du professeur Polonovski.

Dans son laboratoire, où beaucoup de travailleurs étaient attirés par sa notoriété, son affabilité, sa simplicité, son désir d'aider les jeunes. Il exerçait son sens critique devant les résultats que chacun lui apportait, soupçonnant ici une erreur expérimentale, là un emballement irréfléchi, mais s'enthousiasmant chaque fois qu'un résultat sûr paraissait atteint. Il enseignait par l'exemple comment on fait la science. C'est ce que ses élèves ont exprimé de touchante façon.

Machebœuf aimait prendre des contacts extérieurs. Il participait à maints Congrès. Sa connaissance des langues étrangères lui rendait faciles les échanges d'idées avec les collègues. Apprécié de tout le monde savant, il fut invité à faire des conférences dans un grand nombre d'Universités ou de Sociétés. Il fut un bon artisan de diffusion de la science française.

En lui, l'homme était digne de toute considération. Citoyen vaillant, il mena à bonne fin des missions délicates ou dangereuses, ce qui lui valut Croix de guerre 1945 et Médaille de la Résistance. Courageux et dévoué, il l'était en tout instant. Familier de la nage comme de presque tous les sports, il lui fut donné d'accomplir plusieurs sauvetages (Médaille de Sauvetage en 1928). Au cours d'une croisière que nous fîmes communément, un matelot tombe à la mer. Dans le canot mis à l'eau et que les vagues secouent vivement, nous distinguons parmi les marins, un passager ; c'était Machéboeuf. Cette fois, hélas ! il n'eut pas la bonne fortune de retrouver le jeune Breton épuisé par l'effort. Je voulais souligner la spontanéité touchante de son geste. Il en fit bien d'autres. L'auteur de ces lignes pourrait dire avec émotion plusieurs de ceux dont il fut le bénéficiaire et qui témoignent de la profondeur de son amitié.

Lauréat de l'Académie des Sciences, de l'Académie de Médecine, d'Académies et Sociétés étrangères, membre du Conseil supérieur d'Hygiène, Machéboeuf, Officier de la Légion d'honneur, avait été élu, en mai dernier, Membre de l'Académie nationale de Médecine. Les consécration d'une belle carrière commençaient à s'accumuler et l'on était en droit d'espérer que, son effort scientifique se poursuivant, il rassemblerait une gerbe encore plus fournie d'attestations de son mérite.

Le sort n'a pas voulu qu'il en fût ainsi. Un mal inexorable

a terrassé ce sportif à la forte stature, cet être si jeune de caractère, que l'on imaginait devoir vivre longtemps plein d'une joyeuse activité. Le 20 août, à 53 ans, Michel Macheboeuf est mort en pleine conscience, en pleine sérénité, comme un homme en le cœur de qui demeure une espérance.

La maison de Pasteur est en deuil de l'un des siens, qui, en pleine maturité de son talent, lui aurait apporté encore de belles réalisations.

Et la désolation est à son foyer — un foyer qui fut heureux et harmonieux — fondé avec une compagne, par l'esprit et le cœur digne de lui. Que Madame Macheboeuf veuille bien accueillir le douloureux et respectueux hommage des Pastorien. Aux enfants de notre ami, à sa maman, tant de fois déchirée dans ses proches affections, nous témoignons de notre affectueuse et respectueuse sympathie. Et puisse l'espérance qui règne en le cœur des siens faire écho à celle qui, à l'heure dernière, illuminait l'âme de leur cher disparu !

M. JAVILLIER.

ÉTUDE DE L'ÉPIDÉMIE DE POLIOMYÉLITE A SAINT-AUGUSTIN (P. Q. CANADA)

II. — ÉVOLUTION DU TAUX DES ANTICORPS NEUTRALISANT LE VIRUS TYPE 2 (LANSING) A LA SUITE DE L'ÉPIDÉMIE DUE AU VIRUS DU TYPE 1 [BRUNHILDE] (*).

par V. PAVILANIS et A. FRAPPIER (**).

*(Service des Virus de l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène
de l'Université de Montréal.)*

Depuis les travaux de Netter et Levaditi [1], les études sur les anticorps anti-poliomyélitiques revêtent un intérêt considérable. Howitt [2], Jensen [3], Eagles et ses collaborateurs [4] ont montré que les formes abortives de la poliomyélite peuvent faire apparaître en abondance des anticorps neutralisant le virus, alors que, au contraire, les formes paralytiques ne favorisent pas une production aussi élevée des mêmes anticorps. Howitt [2], Harmon et Harkins [5], et d'autres auteurs, ne retrouvent cependant ces anticorps que chez 60 p. 100 environ des convalescents ; mais de nombreux travaux [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13] démontrent la présence de ces mêmes anticorps chez 85 à 95 p. 100 des adultes n'ayant jamais été atteints de poliomyélite.

L'adaptation de la souche Lansing aux muridés réalisée par Armstrong [14] a permis d'étendre considérablement le champ des investigations sérologiques. Les études des anticorps anti-Lansing faites sur une plus grande échelle [15, 16, 17, 18, 24, 25] ont confirmé les résultats trouvés par les auteurs précédents.

La classification immunologique des virus poliomyélitiques, réussie grâce à la collaboration de plusieurs laboratoires aux Etats-Unis [19], a révélé que toutes les souches étudiées appartiennent aux trois types immunologiques. Toutefois, on n'a pas

(*) Manuscrit reçu le 8 juillet 1953.

(**) Ce travail a été exécuté avec l'aide du Comité de la Poliomyélite de la Section québécoise de la Légion Canadienne et du ministère de la Santé de la province de Québec. (Subvention fédérale provinciale à la recherche sur la Santé publique.)

pu mettre en évidence des antigènes communs pour ces trois types.

La distribution des anticorps anti-type 1 (Brunhilde) et anti-type 3 (Leon), d'après les travaux de Paul, Melnick, Barnett et Goldblum [20] sur les sérums d'habitants de l'Égypte, semble suivre la courbe de distribution des anticorps du type 2 (Lansing). Mais Paul, Riordan et Melnick [21] ont trouvé, dans la population esquimaude d'Alaska, un pourcentage beaucoup plus faible de sujets possédant les anticorps des types 1 et 3 que de sujets possédant les anticorps du type 2.

Il est néanmoins généralement admis, à la suite des résultats concordants de nombreux travaux, que le taux des anticorps anti-type 2 (Lansing), dans une population donnée, est un indice assez fidèle de l'état d'immunité de cette population, dans son ensemble, vis-à-vis de l'infection par le virus poliomyélique [20, 23, 24, 25].

D'autre part, il est admis que la présence des anticorps anti-poliomyélitiques type 2 dans une population normale est le résultat d'une infection par le virus de la poliomyélite. Melnick et Ledinko [26], en prélevant deux échantillons de sérum, l'un au commencement de l'épidémie et l'autre six mois après ce premier prélèvement, ont constaté chez les enfants de North Carolina une augmentation du titre des anticorps anti-type 2 (Lansing). Ce fait a permis à plusieurs auteurs d'affirmer que la présence d'un taux élevé d'anticorps antipoliomyélitiques chez une proportion considérable de sujets et l'absence des mêmes anticorps chez les sujets plus jeunes indiquent le passage d'une épidémie de poliomyélite [20, 25]. Ces affirmations ne valent que dans les pays isolés et seulement lorsque la poliomyélite y est rare.

Pour cette raison, nous avons trouvé opportun de rechercher les anticorps anti-type 2 (Lansing) chez les habitants de Saint-Augustin au nord-est de la province de Québec, au Canada. En janvier-février 1950, une épidémie de poliomyélite a sévi dans ce village isolé. Pendant l'épidémie, nous avons prélevé les sérums des habitants de cet endroit et avons étudié la distribution des anticorps anti-type 2 (Lansing) dans les divers groupes d'âge. Nous avons constaté qu'il existe une relation étroite entre la fréquence de la poliomyélite parmi les sujets de divers groupes d'âge [24] et la proportion d'entre eux qui ne possèdent pas d'anticorps. Les virus isolés pendant l'épidémie appartiennent au type 1 (Brunhilde). L'identification des souches a été faite par le Dr Charles F. Pait, Département of Bacteriology and Parasitology, University of Southern California.

En vue d'étudier l'évolution du taux des anticorps anti-poliomyélitiques consécutivement à une épidémie, l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal a organisé, en

mars 1952, une deuxième expédition scientifique à Saint-Augustin. Cette expédition a prélevé 347 échantillons du sérum des habitants de ce village.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS. MÉTHODES.

Situation géographique du village de Saint-Augustin. — Saint-Augustin est situé sur la rive nord du golfe Saint-Laurent, près



FIG. 1. — Situation de l'agglomération de Saint-Augustin sur la rive nord du golfe du Saint-Laurent.

de la frontière Québec-Labrador, au nord du 51° parallèle et entre 58° et 59° de longitude (voir fig. 1).

Les habitants. — Quatre cent dix-sept personnes, toutes de race blanche, ont habité ce village en 1952. Toutes habitaient ce village pendant l'épidémie de janvier 1950, à l'exception de 30 enfants qui sont nés après l'épidémie (voir tableau I). Pendant les deux dernières années, 6 personnes sont mortes et 4 familles ont quitté le village.

Epidémie de janvier 1950. — La description complète de la population et des caractères épidémiologiques de l'épidémie de janvier-février 1950 a paru dans notre publication précé

TABLEAU I. — Population de Saint-Augustin en 1952.

	A G E															
	0 à 4 ans	5 à 9 ans	10 à 14 ans	15 à 19 ans	20 à 24 ans	25 à 29 ans	30 à 34 ans	35 à 39 ans	40 à 44 ans	45 à 49 ans	50 à 54 ans	55 à 59 ans	60 à 64 ans	65 à 69 ans	70 à 77 ans	TOTAL
Hommes	34	44	36	19	13	16	10	2	9	10	8	5	6	2	3	217
Femmes	39	42	26	17	16	15	5	12	12	5	3	4	2	0	2	200
TOTAL	73	86	62	36	29	31	15	14	21	15	11	9	8	2	5	417

dente [24]. Rappelons pour le moment que l'épidémie fut très grave. On y a observé des paralysies chez 4,4 p. 100 de la population et seuls les enfants âgés de 2 à 14 ans furent atteints pendant cette épidémie.

Le sérum. — Le sang a été prélevé aseptiquement chez 347 habitants de Saint-Augustin, soit chez 84 p. 100 de la population, deux ans après l'épidémie (voir tableau II). Le sang fut transporté à Montréal, où nous avons recueilli le sérum pour le congeler à -40°C . Au moment de l'emploi, le sérum est décongelé à la température du laboratoire. Deux cent soixante-six paires de sérums provenant des mêmes sujets ont été titrées en même temps, le premier sérum ayant été prélevé en 1950 et gardé à -40°C , et le deuxième, prélevé en 1952, et gardé dans les mêmes conditions. Le titre des sérums prélevés en 1950, tel que déterminé à cette date, n'a pas changé sensiblement lors du retitrage en 1952.

Le virus. — Nous avons employé la souche de virus Lansing adaptée à la souris que MM. Th. Francis et G. C. Brown ont eu l'amabilité de nous expédier d'Ann Arbor. Cette souche, dont la LD₅₀ est de $10^{-2,5}$, tue 90 p. 100 des souris à la dilution 1 : 10.

La préparation du virus, les essais de neutralisation et l'appréciation du degré de positivité ont été faits suivant les techniques décrites dans les publications précédentes [17, 24, 25].

Rappelons seulement que le virus dilué à 1 : 10 est mélangé à parties égales avec les sérums à essayer, dilués eux-mêmes à 1 : 2,5, 1 : 10 et 1 : 40. On obtient ainsi une neutralisation finale du virus à 1 : 20 par des dilutions de sérum à 1 : 5, 1 : 20 et 1 : 80. Ces mélanges sont inoculés à des groupes de 8 souris par

TABLEAU II.

A G E	Population			Sérum étudié			Pourcentage de la population		
	Hommes	Femmes	Total	Hommes	Femmes	Total	Hommes	Femmes	Total
1 à 4 ans	31	36	67	21	29	50	68	80	75
5 à 9 ans	44	42	86	44	40	84	100	95	98
10 à 14 ans	36	26	62	33	25	58	92	96	94
15 à 19 ans	19	17	36	11	13	24	58	76	67
20 à 24 ans	13	16	29	8	14	22	62	88	76
25 à 29 ans	16	15	31	12	13	25	75	87	81
30 à 34 ans	10	5	15	7	4	11	70	80	73
35 à 39 ans	2	12	14	2	9	11	100	75	78
40 à 44 ans	9	12	21	9	10	19	100	83	90
45 à 49 ans	10	5	15	8	5	13	80	100	87
50 à 54 ans	8	3	11	6	3	9	75	100	82
55 à 59 ans	5	4	9	4	4	8	80	100	89
60 à 64 ans	6	2	8	5	1	6	83	50	75
65 à 77 ans	5	2	7	5	2	7	100	100	100
TOTAL	214	197	411	175	172	347	82	87	84.4

dilution. Les animaux restent sous observation pendant trente jours.

Les résultats sont calculés suivant la méthode cumulative de Reed et Muench [30] et, seuls, les sérums donnant une protection cumulative de plus de 50 p. 100 sont considérés comme positifs. ceux qui, positifs à 1 : 5, donnent moins de 30 p. 100 de protection à 1 : 80 sont qualifiés de faiblement positifs (+) ; ceux qui, positifs à 1 : 5, donnent à 1 : 80 plus de 30 p. 100 de protection sont considérés comme fortement positifs (++) .

Tous les tests présentant une irrégularité quelconque sont répétés. Si parmi les 8 souris témoins inoculées avec le virus seul, il y a plus d'une survie, toute l'expérience est recommencée.

RÉSULTATS.

Les résultats de neutralisation indiqués dans la figure 2 et les tableaux III, IV et VI montrent que les enfants nés après l'épidémie possèdent peu d'anticorps. Chez 19 enfants dans ce groupe, nous avons trouvé que 48 p. 100 ne possèdent pas d'anti-

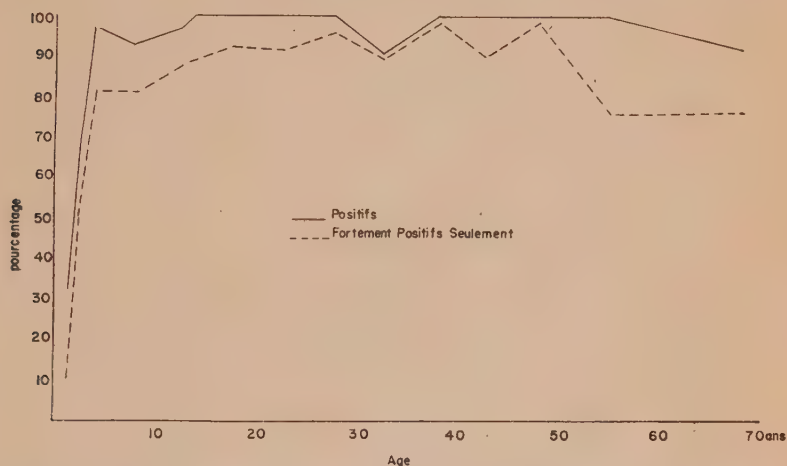


FIG. 2. — Courbe de neutralisation de la souche Lansing pour les sérums de l'ensemble de la population de Saint-Augustin classée par groupes d'âge. Trait plein, sérums positifs; trait interrompu, sérums fortement positifs.

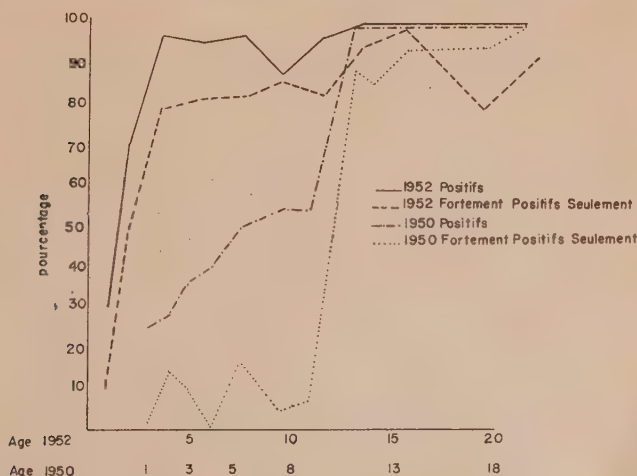


FIG. 3. — Courbes comparées de neutralisation de la souche Lansing par les sérums de la population infantine de Saint-Augustin en 1950 et en 1952.

corps anti-Lansing dans leur sérum. Par contre, chez 35 enfants âgés de 3 à 4 ans qui sont nés avant l'épidémie, nous avons seulement 3 p. 100 de négatifs. Parmi 155 enfants, âgés de 3 à 12 ans, nous avons trouvé seulement 9 (5.8 p. 100) sujets ne possédant pas d'anticorps anti-souche Lansing. Parmi 173 adultes (de 13 à 77 ans), nous avons trouvé seulement 2 sujets négatifs, âgés respectivement de 31 et de 61 ans.

La majorité des enfants nés avant l'épidémie possède un titre

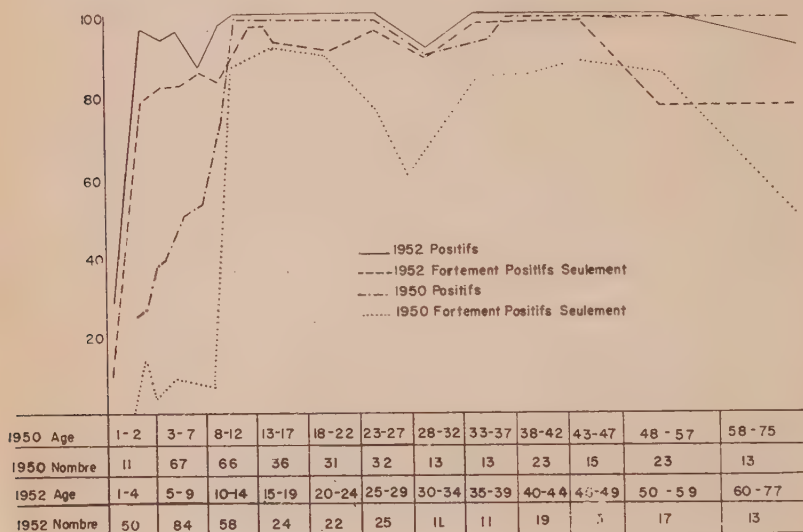


Fig. 4. — Courbes comparées de neutralisation de la souche Lansing par les sérums de l'ensemble de la population de Saint-Augustin en 1950 et en 1952.

d'anticorps assez élevé. Nous avons constaté que 81,9 p. 100 des enfants âgés de 3 à 12 ans possèdent des anticorps à un titre supérieur à 1 : 80. Nos essais sur les sérums prélevés en 1950, de ces mêmes enfants alors âgés de 1 à 10 ans, ont montré que 49,6 p. 100 étaient dépourvus d'anticorps ; 36,6 p. 100 possédaient alors dans leur sérum une quantité assez faible d'anticorps neutralisants et seulement 13,8 p. 100 présentaient des anticorps à un titre supérieur à 1 : 80. Le pourcentage total de positifs chez les enfants âgés de 1 à 10 ans était de 50,4 p. 100 en 1950 ; en 1952, ce taux atteint 94,2 p. 100 (voir tableaux V et VI et fig. 3 et 4).

Chez les sujets âgés de 37 à 75 ans en 1950, le taux des anticorps neutralisant la souche Lansing est resté à peu près le même en 1952. Les différences entre les deux sexes, que nous avons

TABLEAU III. — Résultats.

A G E	Nombre			Pourcentage		
	0	+	++	0	+	++
1 à 4 ans	10	9	31	20	18	62
5 à 9 ans	6	10	68	7	12	81
10 à 18 ans	2	5	51	3	9	88
15 à 19 ans		2	22		8	92
20 à 24 ans		2	20		9	91
25 à 29 ans		1	24		4	96
30 à 34 ans	1	-	10	10	-	90
35 à 39 ans			11			100
40 à 44 ans		2	17		10	90
45 à 49 ans			13			100
50 à 59 ans		4	13		24	76
60 à 77 ans	1	2	10	8	15	77
TOTAL	20	37	290	6	11	83

observées dans les sérums prélevés en 1950, sont devenues minimales en 1952 (voir tableau IV et fig. 4 et 5).

En comparant 266 paires de sérums provenant des mêmes individus, dont le premier sérum a été prélevé en 1950 et le deuxième en 1952, nous avons constaté que 42 p. 100 des sérums de 1952 accusent une augmentation du taux des anticorps et seulement 4 p. 100, une diminution. Il faut souligner que, pour rechercher le taux des anticorps, nous avons utilisé 3 dilutions de sérum : 1 : 5, 1 : 20 et 1 : 80. Les sérums trouvés positifs à la dilution de 1 : 80 (la plus haute utilisée) dans les deux échantillons sont

TABLEAU IV. — Distribution des anticorps selon le sexe.

A G E		Nombre			Pourcentage		
		0	+	++	0	+	++
1 à 4 ans	H	4	5	12	19	24	57
	F	6	4	19	20	18	62
5 à 9 ans	H	3	7	34	7	16	77
	F	3	3	34	7	12	81
10 à 14 ans	H	1	4	28	3	12	85
	F	1	1	23	4	4	92
15 à 19 ans	H			11			100
	F		2	11		15	85
20 à 24 ans	H		1	7		12	88
	F		1	13		7	93
25 à 29 ans	H			12			100
	F		1	12		8	92
30 à 34 ans	H	1	-	6	14	-	86
	F			4			100
35 à 39 ans	H			2			100
	F			9			100
40 à 49 ans	H		2	15		12	88
	F			15			100
50 à 59 ans	H		3	7		30	70
	F		1	6		14	86
60 à 77 ans	H	1	2	7	10	20	70
	F			3			100
TOTAL	H	10	24	141	5.7	13.7	80.6
	F	10	13	149	5.8	7.6	86.6

considérés comme possédant le même titre, mais il est probable que, si on avait recherché le titre des anticorps au moyen de dilutions plus poussées, on aurait pu en observer l'augmentation chez un plus grand nombre de sujets. Nous insistons sur le fait que, seuls 9 enfants, âgés de 3 à 12 ans en 1952, n'ont pas d'anticorps anti-Lansing à cette date dans leur sang. Cinq de ces 9 enfants négatifs avaient contracté une forme paralytique de poliomyélite pendant l'épidémie de 1950.

Si on prend à part les enfants qui ont souffert de poliomyélite

ÉVOLUTION DU TAUX DES ANTICORPS ANTI-POLIOMYÉLITQUES 699

TABLEAU V. — Pourcentage des individus présentant des anticorps selon les groupes d'âge en 1950 et 1952.

	Age en 1950															
	1 à 10 ans				11 à 20 ans				21 à 33 ans				34 à 75 ans			
	Nombre	O	+	++	Nombre	O	+	++	Nombre	O	+	++	Nombre	O	+	++
Hommes	68	47.0	35.3	27.7	40	-	5.0	95	30	3.3	23.3	73.3	42	-	23.8	76.2
Femmes	55	52.7	38.2	9.1	38	-	10.5	89.5	27	3.7	25.9	70.4	38	-	7.9	92.1
Total	123	49.6	36.6	13.8	78	-	7.7	92.3	57	3.5	24.6	71.9	80	-	16.25	83.75

	Age en 1952															
	3 à 12 ans				13 à 22 ans				23 à 35 ans				36 à 77 ans			
	Nombre	O	+	++	Nombre	O	+	++	Nombre	O	+	++	Nombre	O	+	++
Hommes	83	4.8	15.7	79.5	26	-	7.7	92.3	19	5.3	-	94.7	39	2.6	17.9	79.5
Femmes	72	7.0	8.3	84.7	33	-	9.1	90.9	22	-	4.5	95.5	34	-	3.0	97
Total	155	5.8	12.3	81.9	59	-	8.5	91.5	41	2.4	2.4	95.2	73	1.4	10.9	89.7

paralytique, nous trouvons que sur 9 enfants étudiés, 5 sont négatifs, 2 possèdent une faible quantité d'anticorps neutralisants et 2 une forte quantité.

Parmi les 146 autres enfants qui ont eu, soit la poliomyélite non paralytique, soit d'autres maladies sans relation avec la poliomyélite, ou qui, pendant l'épidémie, sont restés en bon état de santé, nous avons trouvé que 84 à 86 p. 100 possèdent des sérums fortement positifs, 10 à 16 p. 100 des sérums faiblement positifs et 3 p. 100 seulement des sérums négatifs.

Dans le tableau VII, nous comparons les résultats obtenus sur des sérums prélevés, les uns en 1950 et les autres en 1952, selon les maladies que les enfants ont faites pendant l'épidémie de 1950. Deux ans après l'épidémie, nous trouvons, parmi les enfants qui ont fait la poliomyélite paralytique, à peu près le même nombre de sujets négatifs que pendant l'épidémie. Par contre, le nombre des négatifs a considérablement diminué dans les autres trois groupes : poliomyélite non paralytique, autres maladies et sans maladie évidente.

Nous n'avons pas pu isoler de nouveau, en 1952, le virus poliomyélique dans les selles des anciens malades ou de leurs contacts. Sur 30 échantillons de selles des enfants de Saint-Augustin, prélevées en mars 1952, nous n'avons isolé aucun

TABLEAU VI. — Pourcentage des individus présentant des anticorps selon les groupes d'âge en 1950 et 1952.

1950					1952				
A G E	Nombre	Pourcentage			A G E	Nombre	Pourcentage		
		0	+	++			0	+	++
1 à 2 ans	12	75	17	8	1 à 2 ans	19	48	21	31
3 à 7 ans	67	57	33	10	3 à 4 ans	31	3	16	81
8 à 12 ans	66	23	36	41	5 à 9 ans	84	7	12	81
13 à 17 ans	34		6	94	10 à 14 ans	58	3	9	88
18 à 22 ans	31		9	91	15 à 19 ans	24	-	8	92
23 à 27 ans	32		22	78	20 à 24 ans	22		9	91
28 à 32 ans	12	8	33	59	25 à 29 ans	25		4	96
33 à 37 ans	14	7	7	86	30 à 34 ans	11	10	-	90
38 à 42 ans	23		13	87	35 à 39 ans	11			100
43 à 47 ans	15		7	93	40 à 44 ans	19		10	90
48 à 57 ans	23		9	91	45 à 49 ans	13			100
58 à 75 ans	13		54	46	50 à 59 ans	17		24	76
					60 à 77 ans	13	8	15	77
Total	338	18.6	23.1	58.3	Total	347	6	11	83

virus. La recherche du virus poliomyélique a été faite en inoculant les singes *Macacus rhesus* par les voies intracérébrale, intranasale et intrapéritonéale avec l'extrait de selles à 10 p. 100 traité par la pénicilline et la streptomycine. Les singes ayant survécu plus de trente jours sans présenter de symptômes cliniques de poliomyélite ont été sacrifiés, le cerveau et la moelle épinière ont été examinés histologiquement.

DISCUSSION.

A Saint-Augustin, nous avons trouvé un rare ensemble de conditions expérimentales pour étudier l'influence d'une épidémie

de poliomyélite sur l'évolution du taux des anticorps présents dans le sérum des habitants. Le village de Saint-Augustin est très

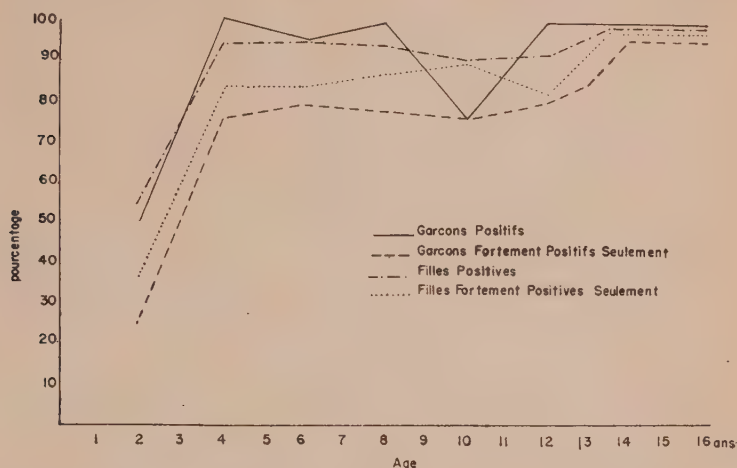


FIG. 5. — Courbes de neutralisation de la souche Lansing par la population enfantine de Saint-Augustin en fonction de l'âge et du sexe

TABLEAU VII. — Pourcentage des individus présentant des anticorps selon la maladie faite pendant l'épidémie de 1950.

		Nombre			Pourcentage		
		0	+	++	0	+	++
Poliomyélite paralytique	1950 -----	6	2	1	66	22	11
	1952 -----	5	2	2	55	22	22
Poliomyélite non paralytique	1950 -----	7	7	5	37	37	26
	1952 -----	0	3	16		16	84
Autres maladies sans indication de poliomyélite	1950 -----	2	5	6	15	39	46
	1952 -----		2	11		15	85
Sans maladie	1950 -----	46	11	5	56	38	6
	1952 -----	4	12	98	3.5	10.5	86

isolé, sa population d'environ 417 habitants est stable, et les relations avec le monde civilisé sont très peu fréquentes. La poliomyélite paralytique y était inconnue jusqu'à 1950. En janvier 1950, une très grave épidémie a sévi dans ce village. On

y a observé 13 cas paralytiques, 5 cas méningés graves et 15 cas bénins. La morbidité a été de 8 p. 100 de la population totale, mais seuls les enfants âgés de 2 à 14 ans ont été touchés par la maladie. Cette épidémie a été causée par un virus poliomyélitique appartenant au type I (Brunhilde).

Nos résultats démontrent qu'une épidémie de poliomyélite causée par un virus appartenant au type I (Brunhilde) fait apparaître des anticorps hétérotypiques anti-type 2 (Lansing) dans la presque totalité de la population. Mais nous avons été frappés du fait que le pourcentage de négatifs soit resté à peu près le même deux ans après l'épidémie chez les enfants qui avaient présenté de la poliomyélite paralytique. Nous avons examiné 8 paires de sérums chez les anciens poliomyélitiques. Dans 3 sérums nous avons observé une augmentation du titre, dans 1 une diminution et les 4 autres sujets sont restés négatifs. Par contre, sur 18 paires de sérums provenant d'enfants qui ont fait des formes non paralytiques de poliomyélite nous avons observé dans 13 cas (72 p. 100) une apparition ou une augmentation du taux des anticorps ; dans les 5 autres cas, le titre déjà à 1 : 80 n'a pas changé. Ainsi, deux ans après l'épidémie, tous les enfants qui ont fait de la poliomyélite non paralytique sont trouvés positifs et le pourcentage de ceux qui possèdent des sérums fortement positifs atteint le même niveau que celui que nous avons trouvé à ce moment chez les enfants de même âge qui sont restés en bon état de santé pendant l'épidémie.

Les enfants, nés après l'épidémie, possèdent un taux d'anticorps beaucoup plus bas que ceux qui sont nés avant l'épidémie de janvier 1950. La constatation simultanée d'une haute fréquence de positivité dans les groupes de sujets plus âgés et l'absence de cas positifs dans les groupes des sujets plus jeunes et l'apparition des anticorps ou de l'augmentation de leur taux en 1952 chez presque tous les enfants nés avant l'épidémie de 1950 nous donnent la preuve qu'on peut fixer chronologiquement et rétrospectivement la date de passage d'une épidémie de poliomyélite dans une population en recherchant la démarcation de l'âge entre les groupes possédant un taux élevé d'anticorps et les groupes ne possédant pas d'anticorps. Il nous est donc permis d'affirmer que, onze ans avant l'épidémie de 1950, soit en 1939, une épidémie de poliomyélite a sévi à Saint-Augustin, même si on ne trouve pas de séquelles cliniques de paralysie infantile.

On admet généralement, et depuis longtemps déjà, que l'apparition des anticorps du type 2 (Lansing) dans une population donnée est un critère du passage du virus, mais, à notre avis, on n'a jamais, jusqu'à présent, démontré irréfutablement cette relation. Paul et Riordan [22], dans leur étude sur les anticorps anti-type 2 chez les Esquimaux d'Alaska, ont observé une apparition brusque des anticorps vers l'âge de 20 ans. De ce fait, ils

ont conclu qu'il y a vingt ans une épidémie de poliomyélite avait sévi dans cette région. Mais cette épidémie particulière ne semble pas prouvée à l'évidence. Clark et Rhodes [27] ont montré une différence entre le taux des anticorps chez les Esquimaux habitant la région dans laquelle la poliomyélite est connue et celui des Esquimaux provenant d'endroits indemnes. Dans la première région, ils ont trouvé que 75 p. 100 des Esquimaux âgés de 15 ans et plus possédaient des anticorps. Par contre, dans la région indemne de poliomyélite, 88 p. 100 des Esquimaux étaient dépourvus d'anticorps neutralisant la souche Lansing. Mais ces deux derniers groupes d'Esquimaux provenaient de régions différentes et, dans la région où des cas de poliomyélite avaient été observés en 1942, ces auteurs n'ont pu étudier les anticorps chez les sujets âgés de moins de 15 ans, ce qui semble affaiblir les conclusions de Clark et Rhodes qui affirment, eux aussi, que l'apparition des anticorps correspond chronologiquement au passage d'une épidémie de poliomyélite.

On a observé depuis longtemps que les enfants normaux possèdent des anticorps neutralisant la souche Lansing dans une proportion beaucoup plus grande que ceux qui sont frappés par la paralysie infantile. Brown et Francis [48], procédant à la recherche des anticorps anti-Lansing chez 287 anciens poliomyélitiques, ont révélé chez ces derniers des taux d'anticorps inférieurs à ceux des enfants normaux, les anticorps n'étant trouvés que chez 35 p. 100 des sérums examinés contre 73 p. 100 chez les témoins.

En recherchant les anticorps anti-Lansing chez les habitants de Montréal, nous avons trouvé 32 p. 100 de négatifs parmi 50 sujets âgés de 5 à 20 ans, qui ont fait la paralysie infantile quatre ans auparavant et 20 p. 100 seulement de négatifs parmi 187 témoins de même âge [47, 25].

La présence des anticorps anti-poliomyélitiques chez les malades et leur évolution ont été bien étudiées par Steigman et Sabin [28]. Ils ont prouvé que, dans la plupart des cas, les anticorps homologues sont déjà présents douze à vingt-quatre heures après l'apparition des premiers symptômes de la maladie, leur taux augmente pendant les semaines suivantes et les anticorps persistent au moins trois ans après la convalescence. De plus, ils rapportent qu'il n'y a pas de corrélation entre le taux des anticorps anti-type 2 (Lansing) et celui des anticorps contre le virus isolé chez le même malade. Sabin [29], après avoir recherché les anticorps du type 2 (Lansing) chez 18 malades, chez qui il a isolé le virus du type 1 (Brunhilde), a trouvé que, chez 11 malades les anticorps anti-type 2 (Lansing) ont apparu ou que leur titre a augmenté de la deuxième à la quatrième semaine de maladie. Mais après trois mois, ces anticorps ont complètement disparu ou leur titre a considérablement diminué.

De même Clark et Rhodes [31], recherchant les anticorps anti-type 2 chez les Esquimaux malades, concluent que les anticorps hétérologues du type 2 (Lansing) persistent seulement un temps limité dans le sang des malades. Ces conclusions concordent bien avec de nombreux travaux publiés à ce sujet [18, 32, 33, 34].

Dans notre série d'observations, les enfants qui ont fait de la poliomyélite paralytique présentent aussi, deux ans après l'épidémie, une augmentation des anticorps du type 2, mais dans une très faible proportion. Sur 8 paires de sérums, nous avons pu observer une augmentation des anticorps dans 3 cas seulement. La majorité des malades reste dépourvue d'anticorps du type 2. Mais tous les enfants qui ont fait de la poliomyélite non paralytique ont acquis des anticorps du type 2 deux ans après l'épidémie ainsi que toute la population de ce village. Il semble que, à Saint-Augustin, les anticorps hétérologues du type 2, apparus sous l'effet de la poliomyélite inapparente qui a touché tout le reste de la population, montraient une persistance beaucoup plus prolongée que ne l'ont fait les anticorps qui ont pu naître sous l'effet de la forme grave de poliomyélite paralytique.

CONCLUSIONS.

Nos recherches ont consisté à déterminer le taux des anticorps anti-poliomyélitiques du type 2 (Lansing) deux ans après une grave épidémie de paralysie infantile dans une population isolée. Nous avons comparé le taux de ces anticorps avec celui que nous avons trouvé pendant l'épidémie.

1° Les enfants nés après l'épidémie possèdent un taux d'anticorps du type 2 beaucoup plus bas que ceux nés avant l'épidémie. 48 p. 100 des enfants âgés de 1 à 2 ans sont négatifs à cette épreuve contre 3 p. 100 des enfants âgés de 3 à 4 ans.

2° Nous avons trouvé une augmentation du taux des anticorps du type 2 dans tous les groupes d'âge, à l'exception des enfants qui ont fait de la poliomyélite paralytique. Sur 9 enfants de ce dernier groupe, 5 sont restés négatifs deux ans après l'épidémie.



Nous exprimons nos remerciements à Monsieur Jean Tassé, M. Sc., aux docteurs Roger Desjardins, D. Bêliveau, Sylvio Désautels et à Monsieur Bernard Marcil, L. S. A., qui ont participé à l'expédition scientifique à Saint-Augustin; à l'Armée Royale Canadienne qui nous a fourni les équipements d'hiver; à toute la population de Saint-Augustin, P. Q. et, en particulier, à Madame Blanche Brenier, I. L., au révérend frère Hachez, o. m. i., et au révérend frère Grenier, o. m. i., pour leur collaboration dans le prélèvement des échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. NETTER et C. LEVADITI. *C. R. Soc. Biol.*, 1910, **68**, 617 et 855.
- [2] B. F. HOWITT. *J. inf. Dis.*, 1932, **51**, 565.
- [3] C. JENSEN. *Rapp. Soc. Méd.*, 1934, **28**, 1007.
- [4] G. EAGLES, C. JENSEN et L. J. HENNINGSSEN. *Lancet*, 1937, **1**, 462.
- [5] P. H. HARMON et H. N. HARKINS. *J. Am. med. Assoc.*, 1936, **107**, 552.
- [6] W. L. AYCOCK et S. D. KRAMER. *J. prev. Med.*, 1930, **4**, 189 ;
J. exp. Med., 1930, **52**, 451.
- [7] R. W. FAIRBROTHER et W. G. S. BROWN. *Lancet*, 1930, **2**, 895.
- [8] H. J. SHAUGHNESSY, P. H. HARMON et F. B. GORDON. *J. prev. Med.*,
1930, **4**, 463.
- [9] H. K. FABER. *J. Am. med. Assoc.*, 1931, **96**, 935.
- [10] E. W. SCHULTZ et P. L. GEBHARDT. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*,
1931, **28**, 409.
- [11] M. H. SOULE et E. B. MCKINLEY. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1931,
29, 168.
- [12] M. BRODIE. *J. Bact.*, 1932, **23**, 102 ; *J. exp. Med.*, 1932, **56**, 507.
- [13] A. NETTER, C. LEVADITI et G. HORNUS. *Bull. Acad. Méd.*, 1933,
109, 529.
- [14] C. ARMSTRONG. *Publ. Health Rep.*, 1939, **59**, 1719.
- [15] T. B. TURNER, L. E. YOUNG et Y. MAXWELL. *Amer. J. Hyg.*, 1945,
42, 119.
- [16] T. B. TURNER, D. H. HOLLANDER, S. BUCKLEY, U. P. KOKKO et
C. P. WINDSOR. *Amer. J. Hyg.*, 1950, **52**, 323.
- [17] V. PAVILANIS et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 145.
- [18] G. C. BROWN et TH. FRANCIS Jr., *J. Immunol.*, 1947, **57**, 1.
- [19] The Committee on Typing of the National Foundation for Infant-
tile Paralysis, *Amer. J. Hyg.*, 1951, **54**, 191.
- [20] J.-R. PAUL, J. L. MELNICK, V. H. BARNETT et N. GOLDBLUM. *Amer.*
J. Hyg., 1952, **55**, 902.
- [21] J.-R. PAUL, J. T. RIORDAN et J. L. MELNICK. *Amer. J. Hyg.*, 1951,
54, 275.
- [22] J.-R. PAUL et J. T. RIORDAN. *Amer. J. Hyg.*, 1950, **52**, 202.
- [23] J.-R. PAUL, J. L. MELNICK et J. T. RIORDAN. *Amer. J. Hyg.*, 1952,
56, 232.
- [24] V. PAVILANIS et A. FRAPPIER. *Ces Annales*, 1951, **81**, 583.
- [25] V. PAVILANIS et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1952, **83**, 1.
- [26] J. L. MELNICK et N. LEDINKO. *Amer. J. Hyg.*, 1951, **54**, 357.
- [27] E. M. CLARK et A. J. RHODES. *Canad. J. Med. Sci.*, 1952, **30**, 390.
- [28] A. J. STEIGMAN et A. B. SABIN. *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 349.
- [29] A. B. SABIN. *J. exp. Med.*, 1952, **96**, 99.
- [30] L. J. REED et H. MUENCH. *Amer. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [31] E. M. CLARK et A. J. RHODES. *Canad. J. Med. Sci.*, 1951, **29**, 216.
- [32] T. B. TURNER et L. E. YOUNG. *Amer. J. Hyg.*, 1943, **37**, 67.
- [33] C. F. PAIT, J. F. KESSEL et P. GROSSMAN. *Amer. J. Hyg.*, 1948,
47, 335.
- [34] W. M. HAMMON, W. N. MACH et W. C. REEVES. *J. Immunol.*, 1947,
57, 285.

ESSAI DE SUBDIVISION DE QUELQUES LYSOTYPES B VI DE *SALMONELLA PARATYPHI* B

par PIERRE NICOLLE, YVES HAMON et EWALD EDLINGER (*).

(Institut Pasteur, Service des Bactériophages.)

La méthode de lysotypie de *S. paratyphi* B, mise au point par Felix et Callow [1], permet actuellement de classer les cultures de cette espèce en 10 types au moyen d'une série de bactériophages spécialement adaptés. On sait tout le parti que l'on peut tirer en épidémiologie de cette caractérisation lysotypique.

Les auteurs sont parvenus à ce résultat en trois étapes :

1° Ils ont d'abord créé, en 1943, cinq types : 1, 2, 3 a, 3 a 1 et 3 b.

2° A ces 5 premiers types, ils ont ajouté en 1951 5 nouveaux types : Beccles, Taunton, Dundee, B. A. O. R. et Jersey [2].

3° Enfin ils ont proposé la subdivision de certains types parmi les plus fréquents en Angleterre par l'interprétation des différences entre les images lysotypiques avec les phages non spécifiques des types (variations des types 1, 3 a, 3 a 1 et 3 b).

Ainsi, la méthode n'a cessé de gagner en précision au fur et à mesure que le morcellement de l'espèce s'est accru.

Dans le présent travail, nous proposons une nouvelle subdivision de quelques types, basée sur l'hétérogénéité de l'état lysogène parmi les cultures d'un même type.

I. — PRINCIPE DE CETTE NOUVELLE SUBDIVISION : HÉTÉROGÉNÉITÉ DANS L'ÉTAT LYSOGÈNE.

a) RAPPEL DU RÔLE DE L'ÉTAT LYSOGÈNE COMME FACTEUR DÉTERMINANT L'APPARTENANCE AUX DIFFÉRENTS TYPES DE FELIX ET CALLOW. — Tous les bacilles paratyphiques B, à quelque type qu'ils appartiennent, sont lysogènes, c'est-à-dire qu'ils libèrent un ou plusieurs bactériophages dans les milieux de culture où ils se multiplient [2, 3].

L'état lysogène d'un bacille, c'est-à-dire l'état défini par le nombre et la qualité propre ou, si l'on veut, l'individualité des

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1953.

phages présents, est constant dans les cultures appartenant à un même type, sauf pour quelques exceptions qui seront examinées plus loin. Mais il varie d'un type à l'autre. C'est ainsi que certains types possèdent un seul phage, d'autres deux, d'autres trois, d'autres enfin probablement quatre.

Ces bactériophages, dans les conditions habituelles, n'exercent pas d'effet lytique sur les bacilles qui les élaborent. Leur présence potentielle (prophage) ou réelle (phage libre) dans les cultures rend celles-ci résistantes aux phages apparentés extraits d'autres bacilles, mais elle ne les protège pas contre des phages non apparentés.

L'analyse de l'état lysogène des différents types de *S. paratyphi* B et les expériences de transformation des types au moyen de phages extraits des autres types nous ont montré que ces phages de lysogénéité peuvent se comporter de trois manières différentes :

1° La présence d'un phage chez un bacille peut à elle seule constituer le facteur qui détermine le type de ce bacille. Un tel phage sera dit « déterminant » pour le type.

2° L'appartenance au type peut être déterminée, non plus par la présence d'un seul phage de lysogénéité, mais par celle de deux phages. Chacun de ces phages est dit « demi-déterminant » pour le type.

3° Enfin, certains phages ne semblent jouer aucun rôle dans l'appartenance au type. Ils sont dits « indifférents » pour le type.

Ainsi, pour la majorité des types, les échantillons appartenant à un même type présentent un état lysogène constant. C'est cet état lysogène qui « marque » les bacilles de ce type et leur confère leur image caractéristique de sensibilité aux phages de la lysotypie.

Dans quelques cas, nous avons constaté cependant l'existence de phages indifférents chez certaines cultures et leur absence chez d'autres cultures du même type.

A côté des types dont l'état lysogène est constant chez tous les échantillons, il existe donc des types qui présentent une hétérogénéité dans leur état lysogène.

b) HÉTÉROGÉNÉITÉ DANS L'ÉTAT LYSOGÈNE PARMI LES SOUCHES DES TYPES 1, 3 a 1 ET 3 b. — Les cultures du type 1 présentent une hétérogénéité dans leur état lysogène. D'une part, une grande partie des cultures (groupe I) libèrent un phage inactif sur l'immense majorité des bacilles paratyphiques B et actif en dehors de l'espèce, sur la souche n° 65 de *S. Dublin* et, dans l'espèce seulement, sur un petit nombre de souches du même lysotype. Ces souches (groupe II) [nous en possédons quatre] présentent la particularité de décomposer le *d.tartrate* (variété *d.tartrate* positive de *S. paratyphi* B).

D'autre part, ces quatre souches *d.*tartrate positives ne libèrent pas de phage actif sur *S. Dublin*. L'une d'entre elles (44 231 de la collection de l'Institut Pasteur de Lille) a été trouvée lysogène par le Dr Felix. Son phage de lysogénéité (« natural » phage) agit sur les cultures des types Taunton et B. A. O. R.

Cette « hétérogénéité » parmi les cultures du type 1 offre le moyen de classer ces cultures en deux sous-types suivant leur résistance ou leur sensibilité au phage extrait des cultures du groupe I.

Malheureusement, cette subdivision ne paraît pas devoir présenter un intérêt pratique bien grand, puisque le deuxième sous-type constitue une exception rare.

Les cultures du type 3 a 1 appartenant au groupe dont le modèle est la souche type B. 624 de Felix et Callow sont lysogènes pour les cultures du groupe de la souche type 3 a 1 B. 1305.

De même, nous avons constaté que les cultures du type 3 b sont lysogènes entre elles : certaines cultures de ce type élaborent deux bactériophages, d'autres un seul. Il est possible que cette hétérolysogénéité parmi les cultures du type 3 b présente un intérêt épidémiologique. Nous ignorons actuellement si ces différents sous-types correspondent « aux variations » de Felix et Callow parmi les cultures appartenant au type 1, 3 a 1 et 3 b.

c) HÉTÉROGÉNÉITÉ DANS L'ÉTAT LYSOGÈNE PARMI LES ÉCHANTILLONS DU TYPE BECCLES [3]. — Toutes les cultures du type Beccles libèrent un phage (phage *a*) qui est le phage « déterminant » pour le type Beccles (tableau I, colonne 1) : si l'on contamine une culture du type 3 b (type de base pour le type Beccles) par ce phage extrait d'une culture Beccles quelconque, on lui confère le type Beccles.

Les cultures du type Beccles sont, bien entendu, toutes résistantes à ce phage *a* (tableau I, colonne 2).

Mais, tandis qu'un groupe de cultures du type Beccles [sous-type B₂] (tableau I, ligne I) ne libère que le phage *a*, un autre groupe [sous-type B₁] (tableau I, ligne II) élabore un deuxième phage, le phage *c* (tableau I, colonne 5) et un dernier groupe [sous-type B₀] (tableau I, ligne III) libère un troisième phage, le phage *b* (tableau I, colonne 3).

Les phages *b* et *c* sont indifférents pour le type Beccles : si l'on contamine une culture du type Beccles avec l'un ou l'autre de ces phages, on ne constate aucune transformation de type décelable par la lysotypie de Felix et Callow.

d) SUBDIVISION DU TYPE BECCLES EN TROIS SOUS-TYPES. — Les cultures du groupe B₂ sont sensibles aux phages *b* et *c* qu'elles n'élaborent pas (tableau I, colonnes 4 et 6). Les cultures du groupe B₁ sont sensibles au phage *b* qu'elles n'élaborent pas

TABLEAU I. — Subdivision du type Beccles basée sur l'hétérogénéité de l'état lysogène parmi les cultures de ce type.

SOUS-TYPES	PHAGES EXTRAITS DES DIFFÉRENTS SOUS-TYPES DU TYPE BECCLES					
	<i>a</i> déterminant		<i>b</i> indifférent		<i>c</i> indifférent	
	1 Présence	2 Sensibilité	3 Présence	4 Sensibilité	5 Présence	6 Sensibilité
I. B ₂ . .	P	—	—	S	—	S
II. B ₁ . .	P	—	—	S	P	—
III. B ₀ . .	P	—	P	—	—	—
	Le phage <i>a</i> est présent chez toutes les cultures du type Beccles.		Le phage <i>b</i> est absent chez certaines cultures (B ₂ et B ₁) et présent chez d'autres (B ₀). Il est indifférent pour le type Beccles, mais « déterminant » pour le sous-type B ₀ , qu'il protège à la fois contre les phages <i>b</i> et <i>c</i> .		Le phage <i>c</i> est absent chez certaines cultures (B ₂ et B ₀) et présent chez d'autres (B ₁). Il est indifférent pour le type Beccles, mais « déterminant » pour le sous-type B ₁ , qu'il protège contre l'action du phage <i>c</i> seul.	

P, présence ; S, sensibilité ; —, ni présence, ni sensibilité.

(tableau I, colonne 4), mais elles sont résistantes au phage *c* qu'elles portent (tableau I, colonne 6).

Les cultures du groupe B₀ sont résistantes au phage *b* qu'elles élaborent, ce qui se comprend, mais elles sont également résistantes au phage *c* qu'elles ne contiennent pas : la présence du phage *b* prémunit les cultures à la fois contre le phage *b* et contre le phage *c*. La réciproque n'est pas exacte : la présence du phage *c* ne protège pas contre l'action du phage *b*.

Nous voyons donc qu'au moyen de deux phages indifférents extraits des groupes B₁ et B₀ on peut subdiviser le type Beccles en trois sous-types, les sous-types B₂, B₁ et B₀.

Les phages *b* et *c*, indifférents pour le type dans la lysotypie classique, du fait de la présence du premier dans les cultures du groupe B₀ et du second dans les cultures du groupe B₁, peuvent être considérés, dans une lysotypie auxiliaire comme celle que nous proposons, comme des phages respectivement déterminants pour les sous-types B₀ et B₁.

e) INTRODUCTION D'UN NOUVEAU PHAGE, LE PHAGE B₀. — En régénérant un mutant du phage « B. A. O. R. » sur une culture du sous-type B₀ du type Beccles nous avons obtenu un phage,

le phage B_0 , qui, employé à la dilution critique, peut être considéré comme spécifique du sous-type B_0 , bien qu'il donne également la lyse confluyente avec les cultures du sous-type B_2 .

L'introduction de ce phage B_0 dans la série des phages de la lysotypie de Felix et Callow permet d'obtenir la subdivision du type Beccles en trois sous-types sans le secours des phages b et c . En effet (tableau III), le sous-type B_2 est sensible à la fois au phage B_0 et au phage Dundee. Le sous-type B_1 n'est pas sensible au phage B_0 . Enfin, le sous-type B_0 est sensible au phage B_0 , mais il est résistant au phage Dundee.

f) VALEUR ÉPIDÉMIOLOGIQUE DES TROIS SOUS-TYPES DU TYPE BECCLES. — Le type Beccles n'est pas très fréquent en Europe. Aussi n'avons-nous pu réunir qu'un très petit nombre d'observations de foyers du type Beccles. Cependant, les résultats de la subdivision du type Beccles en trois sous-types sont très encourageants : toutes les cultures de chacun des foyers étudiés appartenaient à un même sous-type (tableau II).

TABLEAU II.

SOUS-TYPES	PHAGES DE FELIX ET CALLOW				PHAGE B_0	FOYERS ÉPIDÉMIQUES
	Beccles	Taunton	BAOR	Dundee		
B_2 . .	LC	LC	—	LC	LC	Foyer La Baule (4 cultures)(1) Foyer Assen (6 cultures). Foyer Nantes (7 cultures). Foyer Cholet (8 cultures).
B_1 . .	LC	LC	—	LC	—	Nombreux foyers d'Autriche.
B_0 . .	LC	LC	LC ou —	—	LC	Foyer Midwoud (2 cultures) (1).

LC, lyse confluyente.

(1) Souches envoyées par le Dr Scholtens, d'Utrecht, auquel nous adressons nos remerciements. Le Dr Scholtens avait remarqué de son côté que l'état lysogène des souches d'Assen et des souches de Midwoud était différent.

L'utilité des phages b , c et B_0 ne paraît pas se limiter au type Beccles. Le type Jersey fournit généralement la lyse confluyente avec le phage B_0 , mais certaines souches sont résistantes.

La majorité des cultures du type Taunton sont sensibles aux phages b et c ; mais elles sont résistantes au phage B_0 . Quelques souches sont lysées par les trois phages. Enfin, un troisième

groupe est constitué par des cultures résistantes aux trois phages.

SOUS-TYPE	PHAGE <i>b</i>	PHAGE <i>c</i>	PHAGE B ₀
Tn ₁	LC	LC	0
Tn ₂	LC	LC	LC
Tn ₃	0	0	0

Pour le type B. A. O. R. la majorité des cultures résistent au phage *c* et sont lysées par le phage B₀ ; toutefois, dans quelques cas rares, les cultures sont sensibles aux deux phages.

Le type Dundee fournit les schémas suivants avec les nouveaux phages :

SOUS-TYPE	PHAGE <i>b</i>	PHAGE <i>c</i>	PHAGE B ₀
D ₁	LC	0	+++
D ₂	LC	0	0
D ₃	LC	+++	0

Le groupe Z (cultures non caractérisables) se montre également hétérogène dans sa sensibilité aux nouveaux phages ; on obtient les deux schémas suivants :

SOUS-GROUPE	PHAGE <i>b</i>	PHAGE <i>c</i>	PHAGE B ₀
Z ₁	LC	0	0
Z ₂	0	0	0

Mais l'intérêt pratique de la subdivision des types Taunton, B. A. O. R. et Dundee et du groupe Z, telle que nous l'avons obtenue jusqu'ici, est à peu près nul en raison de la disproportion considérable de fréquence entre les différents sous-types.

DISCUSSION. — La méthode de lysotypie de Felix et Callow permet de caractériser près de 99 p. 100 des bacilles paratyphiques B qu'on isole en Europe. Malgré cet excellent résultat, il faut reconnaître que l'efficacité de son application en épidémiologie se trouve souvent réduite par suite du manque de variété des types présents dans de nombreux pays et de la prédominance excessive de l'un d'entre eux. C'est ainsi qu'en France, de 1949 à 1952, trois types ont été communs : le type Taunton (43 p. 100 des cas), le type Dundee (34 p. 100) et le type Jersey (14 p. 100). Le type Beccles a été moins fréquent (2,5 p. 100). Les autres types ont été rares (1, 3 a 1, 3 a, 3 b) ou bien n'ont jamais été trouvés (2, B. A. O. R.) [4].

Il est évident que, dans de telles conditions, la rencontre de bacilles appartenant à un type commun dans l'étude épidémiologique de foyers voisins ne présente qu'une faible signification.

Cette situation défavorable est encore aggravée par la prépondérance, quelquefois même par la présence exclusive d'un type dans une région : le type Taunton en Vendée et dans le Bas-Rhin, le type Dundee dans les communes côtières du pays de Caux, le

type Jersey dans les départements du sud de la Bretagne et en Anjou.

Dans le présent travail nous proposons de remédier à ces inconvénients par la subdivision de certains types de *S. paratyphi* B.

Pour effectuer cette subdivision, nous nous sommes appuyés sur le principe suivant : les cultures de certains types (1, 3 a 1, 3 b et Beccles) ne présentent pas un état lysogène constant : certains échantillons libèrent des phages supplémentaires qui ne jouent aucun rôle dans l'appartenance au lysotype (phages indifférents). La présence de tels phages chez certaines cultures et leur absence chez d'autres cultures du même type déterminent leur résistance ou leur sensibilité à ces phages indifférents. On possède ainsi un moyen de subdiviser certains types en deux ou trois sous-types.

Nous avons étudié d'une manière plus approfondie la subdivision du type Beccles. Trois sous-types ont été ainsi créés : les sous-types B₂, B₁ et B₀.

L'addition ultérieure du phage adapté B₀ aux phages de la lysotypie de Felix et Callow simplifie cette subdivision.

L'étude de quelques foyers épidémiques a donné des résultats encourageants, mais seule une expérience plus étendue nous renseignera sur la valeur épidémiologique de cette subdivision.

Ces résultats présentent, nous ne nous le dissimulons pas, un intérêt plus théorique que pratique (du moins pour les cultures de *S. paratyphi* B isolées en France).

Il aurait été beaucoup plus souhaitable de trouver un moyen de fragmenter les types Taunton, Dundee et Jersey. Malheureusement, chacun de ces types semble posséder un état lysogène uniforme. Le principe sur lequel nous sommes appuyés pour effectuer la subdivision des types 1, 3 a 1, 3 b et Beccles n'est donc pas applicable aux 3 types les plus communs en France. Il est permis d'espérer qu'on parviendra néanmoins à ce résultat par un autre procédé.

CONCLUSIONS.

L'hétérogénéité constatée dans l'état lysogène de certains types de *S. paratyphi* B a permis de subdiviser ces types, notamment le type Beccles, en un certain nombre de sous-types.

La concordance de cette subdivision avec les données épidémiologiques fournit un argument en faveur de son intérêt pratique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. FELIX et R. B. CALLOW. *Brit. med. Bull.*, 1943, **2**, 127.
- [2] A. FELIX et R. B. CALLOW. *Lancet*, 1951, **261**, 10.
- [3] P. NICOLLE et Y. HAMON. *Ces Annales*, 1951, **81**, 614.
- [4] P. NICOLLE, Y. HAMON et E. EDLINGER. *Biol. méd.*, 1953, **42**, n° 5.

**LES RÉACTIONS CELLULAIRES ET LA PHAGOCYTOSE
CHEZ LES COBAYES
INOCULÉS PAR VOIE INTRAPÉRITONÉALE
AVEC DES BACILLES DE HANSEN
VIVANTS OU MORTS**

par R. CHAUSSINAND et C. TOUMANOFF. (*).

(Institut Pasteur.)

La résistance du cobaye à l'infection lépreuse est un fait qui n'exige ni vérification, ni l'appui d'observations nouvelles. Toutefois, les modalités de la destruction des bacilles de Hansen dans l'organisme du cobaye n'ont pas été précisées. Pour chercher à élucider cette question, nous avons d'abord étudié la réaction cellulaire déterminée par l'inoculation intrapéritonéale de bacilles de Hansen vivants ou morts.

Metelnikov et l'un de nous [3, 4] ont noté les réactions des cellules dans le péritoine du cobaye après l'injection, soit de substances inertes (encre de Chine, carmin), soit de microbes divers, pathogènes ou non, et ont pu démontrer la spécificité des réactions cellulaires dans chaque cas particulier. La technique suivante était utilisée dans ces recherches.

L'inoculation est pratiquée par voie intrapéritonéale en évitant soigneusement de blesser l'intestin. Les prélèvements de l'exsudat sont effectués à l'aide d'une pipette stérile à extrémité légèrement recourbée, d'abord pendant les premières heures qui suivent l'injection et ensuite tous les 2 jours.

Pour établir la formule leucocytaire, on compte 200 leucocytes. L'étude de la phagocytose demande l'examen de 200 cellules de chaque type. Le pourcentage des cellules contenant des microbes est désigné sous le nom d'« index phagocytaire ».

Nous avons employé cette technique pour l'étude de la réaction cellulaire et de la phagocytose des bacilles de Hansen dans le péritoine du cobaye.

Dans l'inflammation, quelle qu'en soit l'origine, l'activité des phagocytes ne se manifeste pas uniquement par l'englobement

(*) Manuscrit reçu le 9 juillet 1953.

des substances étrangères, elle se traduit encore par la destruction des phagocytes mêmes par d'autres phagocytes. Ce phénomène dénommé « autophagie leucocytaire » [6] a été également étudié au cours de nos observations.

Dans notre expérimentation, les inoculations intrapéritonéales ont été pratiquées avec les substances suivantes :

1° Bacilles de Hansen (léprome broyé) vivants en suspension à 5 p. 100 dans l'eau physiologique ;

2° Antigène de Mitsuda, c'est-à-dire bacilles de Hansen (léprome broyé) tués par ébullition, en suspension à 5 p. 100 dans l'eau physiologique, puis phéniquée à 0,5 p. 100 ;

3° Bacilles de Hansen (léprome broyé) tués par ébullition en suspension à 5 p. 100 dans l'eau physiologique.

Toutes ces suspensions bacillaires ont été préparées avec un seul gros léprome, très riche en germes, provenant d'un malade lépromateux non traité.

Les prélèvements des exsudats ont été effectués tous les 2 jours et cela, en général, pendant plusieurs mois. Mais, pour ne pas trop allonger les tableaux, nous nous abstenons d'y incorporer les résultats constatés au delà du 30^e jour. Nous rapporterons ces observations dans le texte et nous nous bornerons à indiquer les résultats du dernier examen à la fin de chaque tableau. A noter que les expériences que nous citons à titre d'exemple ont été répétées plusieurs fois et ont donné des résultats identiques à quelques détails près.

I. — INOCULATION DE BACILLES DE HANSEN VIVANTS.

Dans les expériences avec les bacilles vivants, nous avons procédé, par voie intrapéritonéale, à l'injection de doses croissantes : 1 cm³, 1,5 cm³ et 2 cm³ d'une suspension de 1 g de léprome broyé dans 20 cm³ d'eau physiologique. Nous ne relaterons à titre d'exemple que deux de ces expériences.

Expérience A (tableau I).

Dans cet essai, le cobaye a reçu 1 cm³ de la suspension de léprome et l'étude de la réaction cellulaire dans l'exsudat a été poursuivie pendant 50 jours.

Réaction cellulaire. — On constate, 4 heures et 7 heures après l'inoculation, la prédominance des polynucléaires (94 et 87 p. 100). Mais, au cours du 2^e jour, leur nombre baisse (12 p. 100) et l'on note, à partir du 10^e jour, des pourcentages variant entre 27 et 53. La réaction observée dans ce cas peut être définie comme mono-lymphocytaire à poussées irrégulières de polynucléose.

Phagocytose. — La phagocytose par les polynucléaires ne s'est

TABLEAU I. — Inoculation de bacilles de Hansen vivants.

 (1 cm³ d'une suspension à 5 % de lépromes broyés)

Temps	Formule leucocytaire			Phagocytose			Bacilles libres
	Poly	Mono	Lympho	Poly	Mono	Autoph	
1 h.30	47	53	0	28	50	0	+++
4 h.	94	6	0	4	1	0	++
7 h.	87	13	0	10	20	0	++
24 h.	50	50	0	11	31	3	+
2 jours	12	79	9	5	39	0	+
4 -	11	83	6	2	16	0	
6 -	14	70	16	0	22	0	+
8 -	25	47	28	0	14	1	
10 -	27	41	32	0	10	1	
12 -	29	45	26	0	12	1	
14 -	23	47	30	0	18	1	
16 -	46	33	21	0	10	0	
18 -	27	48	25	0	10	0	
20 -	37	47	16	0	3	0	
22 -	49	28	23	0	5	1	
25 -	46	34	20	0	4	0	
27 -	50	22	28	0	0	0	
30 -	53	30	17	0	1	0	
50 -	19	60	21	0	5	2	

manifestée que les 4 premiers jours, tandis que les mononucléaires ont contenu des bacilles de Hansen pendant toute la durée de l'observation. L'index phagocytaire des mononucléaires a varié de 1 à 50 les 14 premiers jours, puis il est tombé les jours suivants de 10 à 0.

Autophagie. — L'autophagie s'est montrée faible et n'a pas dépassé 3 p. 100, mais elle a pu être constatée encore 50 jours après l'inoculation. Au début, on enregistrait surtout la phagocytose des polynucléaires par les mononucléaires, mais ensuite les mononucléaires n'englobaient dans leur protoplasme que des mononucléaires. Nous avons vu quelquefois des macrophages contenir jusqu'à 5 cellules en voie de digestion.

Bacilles libres. — On ne note la présence de bacilles libres dans l'exsudat que pendant les 6 premiers jours.

Expérience B (tableau II).

Dans ce cas la dose inoculée a été de 2 cm³.

Réaction cellulaire. — A partir du 2^e jour, ce sont également les mononucléaires et les lymphocytes qui constituent la majeure

partie des cellules constatées dans l'exsudat avec prédominance variable de l'un ou de l'autre type. On note toutefois que les polynucléaires se maintiennent à un niveau assez élevé atteignant, le 20^e et le 30^e jour, 40 et 47 p. 100 du total des éléments figurés.

TABLEAU II. — **Inoculation de bacilles de Hansen vivants.**
(2 cm³ d'une suspension à 5 % de lépromes broyés).

Temps	Formule leucocytaire			Phagocytose			Bacilles libres
	Poly	Mono	Lympho	Poly	Mono	Autoph	
1 h.30	80	20	0	47	21	0	+ + +
4 h.	84	16	0	34	15	1	+ +
7 h.	70	30	0	30	19	0	+ +
24 h.	-	-	-	-	-	-	-
2 jours	8	88	4	10	4	0	+
5 -	9	81	10	0	31	0	+
7 -	28	36	36	0	15	0	+
9 -	11	52	37	0	43	0	
11 -	18	64	28	0	25	2	
12 -	15	31	54	0	19	2	
14 -	25	57	18	0	15	1	
16 -	22	15	27	0	19	0	+
18 -	33	41	26	0	3	0	
20 -	40	35	25	0	1	1	
22 -	30	47	23	0	2	0	
25 -	29	22	49	0	0	0	
27 -	20	43	37	0	2	0	
30 -	47	28	25	0	3	0	
191 -	22	53	25	0	0	0	

Phagocytose. — Aucune particularité n'a été observée en ce qui concerne la phagocytose, l'activité phagocytaire des polynucléaires s'arrêtant définitivement après 48 heures, celle des mononucléaires se poursuivant jusqu'au 68^e jour.

Autophagie. — Comme dans l'expérience A, l'autophagie s'est montrée faible, variant de 1 à 2 p. 100 les 30 premiers jours, puis se manifestant irrégulièrement jusqu'au 107^e jour, date à laquelle elle a été constatée la dernière fois.

Bacilles libres. — Des bacilles libres ont été vus dans l'exsudat les 7 premiers jours. Ensuite, ils n'ont été observés que rarement et en petit nombre (16^e et 32^e jours).

II. — INOCULATION DE BACILLES DE HANSEN MORTS.

Pour l'étude de la réaction cellulaire et de la phagocytose chez le cobaye après l'inoculation de bacilles de Hansen morts, nous

nous sommes d'abord servis de l'antigène de Mitsuda (suspension de 1 g de léprosome broyé, soumis à l'ébullition pendant 1 heure dans 20 cm³ d'eau physiologique, puis phéniquée à 0,5 p. 100).

Voici, à titre d'exemple, le résultat d'une de ces expériences.

Expérience A (tableau III).

Dans ce cas, le cobaye a reçu en injection intrapéritonéale 2 cm³ d'antigène de Mitsuda.

Réaction cellulaire. — La polynucléose, forte au début, fait place le 2^e jour à la mononucléose et à la lymphocytose. Les macrophages et lymphocytes se rencontrent, soit en nombre à peu près égal, soit avec prédominance d'une forme cellulaire sur l'autre. La réaction cellulaire se révèle donc du type monolymphocytaire, comme après l'injection de bacilles vivants.

TABLEAU III. — Inoculation de bacilles de Hansen morts.
(2 cm³ d'antigène de Mitsuda).

Temps	Formule leucocytaire			Phagocytose			Bacilles libres
	Poly	Mono	Lympho	Poly	Mono	Autoph	
1 h. 30	87	9	4	1	1	0	+ + +
4 h.	83	15	2	1	5	0	+ +
7 h.	53	45	2	1	6	0	+
24 h.	59	35	6	0	2	0	+
48 h.	17	47	36	1	5	5	
4 jours	4	50	46	0	2	0	
6 -	8	60	37	0	3	0	
8 -	12	43	45	0	1	0	
10 -	9	57	34	0	3	0	
12 -	18	44	38	0	5	0	
15 -	10	45	45	0	2	1	
19 -	5	35	60	0	3	0	
22 -	16	47	37	0	4	0	
26 -	13	46	41	0	8	1	
28 -	19	49	32	0	7	1	
31 -	17	33	50	0	2	0	
149 -	12	63	35	0	0	0	

Phagocytose. — La phagocytose des bacilles lépreux morts, phéniqués à 0,5 p. 100, est beaucoup plus faible que celle des germes vivants. La présence de polynucléaires contenant des bacilles n'a été observée que pendant 48 heures et leur nombre n'a jamais dépassé la proportion de 1 p. 100. Les mononucléaires sont entrés en action également 1 h. 30 après l'inoculation, mais

leur index phagocytaire était faible. Les index les plus élevés (8 et 7) ont été relevés les 26^e et 28^e jours. Ensuite, les bacilles n'ont été rencontrés dans les macrophages que très irrégulièrement (33^e, 45^e, 47^e, 81^e et 117^e jours) et cela dans 2 p. 100 des cellules au maximum. Notons encore que, du 117^e au 149^e jour, nous n'avons plus trouvé de bacilles dans les mononucléaires malgré des recherches minutieuses.

Autophagie. — L'autophagie s'est manifestée de manière faible et irrégulière. Les pourcentages des macrophages contenant soit des microphages, soit des macrophages, variaient entre 1 et 5. Nous avons pu observer l'autophagie encore 45, 51 et 53 jours après l'inoculation.

Bacilles libres. — Les bacilles libres ont disparu rapidement. Après 24 heures, plus aucun germe non phagocyté n'a été trouvé dans l'exsudat.

Expérience B (tableau IV).

Les essais d'inoculation aux cobayes de 2 cm³ d'une suspension de 1 g de lépromme broyé, soumis à l'ébullition pendant 1 heure, dans 20 cm³ d'eau physiologique, sans addition d'acide

TABLEAU IV. — Inoculation de bacilles de Hansen morts.

(2 cm³ d'une suspension à 5 % de lépromme broyé).

Temps	Formule leucocytaire			Phagocytose			Bacilles libres
	Poly	Mono	Lympho	Poly	Mono	Autoph	
1 h.30	40	30	30	0	0	1	+++
4 h.	69	13	18	0	0	1	+++
7 h.	42	37	21	0	5	2	+++
24 h.	64	31	5	1	8	1	++
2 jours	25	56	19	0	6	0	+
3 -	36	56	8	0	2	2	
5 -	33	39	28	0	7	2	
7 -	33	26	41	0	8	0	
9 -	43	26	31	0	9	1	
11 -	29	50	21	0	13	0	
13 -	25	23	52	0	15	0	
15 -	17	46	37	0	16	0	
17 -	16	61	23	0	0	0	
19 -	7	43	50	0	0	0	
23 -	48	37	15	0	0	0	
26 -	35	43	22	0	0	0	
28 -	42	34	24	0	0	0	
31 -	37	45	18	0	0	0	
193 -	17	54	29	0	0	0	

phénique ont donné des résultats semblables à ceux obtenus avec l'antigène de Mitsuda.

Réaction cellulaire. — La polynucléose du début a été moins forte qu'après l'injection de l'antigène de Mitsuda. La réaction était également du type mono-lymphocytaire.

Phagocytose. — Nous n'avons pu déceler des bacilles dans les polynucléaires que sur un frottis et cela dans la proportion de 1 p. 100 seulement. L'index phagocytaire des mononucléaires a été plus élevé que dans les cas injectés avec l'antigène de Mitsuda, sans toutefois atteindre l'intensité observée après l'inoculation de doses identiques de germes vivants. Les bacilles ont été vus dans les macrophages, la dernière fois, le 32^e jour après l'inoculation.

Autophagie. — L'autophagie, observée assez régulièrement au début de l'expérience, est devenue très irrégulière à partir du 9^e jour. Du 56^e au 166^e jour, elle n'a plus été constatée.

Bacilles libres. — Les bacilles libres n'ont plus été observés dans l'exsudat après 48 heures.

III. — MODALITÉS DE LA DESTRUCTION DES BACILLES DE HANSEN DANS LES PHAGOCYTES.

En examinant les préparations d'exsudat des divers cobayes, nous avons cherché à connaître les modalités de la destruction du germe de la lèpre dans les leucocytes.

Les polynucléaires n'exercent leur activité phagocytaire que pendant les 2 à 4 premiers jours qui suivent l'injection des bacilles. L'étude des frottis ne nous a pas permis de constater une destruction importante des germes dans les microphages. En effet, les bacilles phagocytés gardent leur aspect normal et restent parfaitement colorables par la méthode de Ziehl. Ils forment très souvent des amas compacts qui peuvent occuper la totalité du protoplasme cellulaire. On observe cependant des images assez fréquentes de phagolyse et, à proximité des cellules lysées, on note quelquefois la présence de groupes de bacilles de Hansen, soit à aspect normal, soit, plus rarement, en état de dégénérescence. Il est peu probable que cette dégénérescence provienne d'un phénomène de bactériolyse extracellulaire. Il s'agit plutôt de bacilles modifiés par l'action des phagocytes et mis en liberté à la suite de la phagolyse subie par les microphages. Nous n'avons jamais observé une destruction totale des bacilles de Hansen dans les microphages, ni même les phases avancées de cette destruction.

Dans les macrophages, au contraire, la destruction des germes est plus manifeste. On note la fragmentation des corps bacillaires en chaînettes de granulations et, parfois, la dissolution des germes et leur transformation en une masse amorphe, colorable en rouge ou en rose par le Ziehl. Cette désintégration bacillaire se remarque dans les macrophages ayant phagocyté des germes ou bien dans

ceux exerçant l'autophagie et contenant à la fois des bacilles et des polynucléaires ou des monocytes en digestion. Quelquefois, nous avons noté un début de destruction des germes, non pas à l'intérieur des monocytes, mais à leur contact immédiat. On observe alors, accolés aux macrophages, de petits amas de bacilles en voie de lyse ayant l'aspect de masses diffuses dans lesquelles on distingue à peine les corps bacillaires.

Sur plusieurs frottis d'exsudat, nous avons constaté, dans le protoplasme cellulaire de macrophages, au voisinage immédiat de germes en voie de destruction, la présence de petits « corpuscules réfringents » de forme variable ressemblant à des cristaux. Ces inclusions n'ont jamais été vues dans l'exsudat normal et elles ne s'observaient que rarement dans les cellules des animaux inoculés avec des bacilles morts. Par contre, on les rencontre en grand nombre chez les animaux injectés avec des bacilles vivants et cela particulièrement 20 à 30 jours après l'inoculation. Dans la plupart des cas, les inclusions sont entourées d'une zone claire qui donne au protoplasme des cellules un aspect vacuolaire. Il est intéressant de noter que les bacilles se trouvant dans les macrophages sont, en général, situés dans une zone protoplasmique plus claire et que le siège des « corpuscules réfringents » semble correspondre à celui des bacilles en voie de destruction. Ces inclusions ont également été décelées dans les macrophages libres de bacilles et dans des cellules ne contenant que des « poussières » acido-résistantes qui peuvent être considérées comme le dernier stade colorable de la désintégration du bacille de Hansen [2]. Il est évident que la nature de ces « corpuscules réfringents » est difficile à préciser, mais on peut se demander s'il ne s'agit pas de produits de désintégration des bacilles lépreux digérés, ou alors, d'inclusions résultant d'une réaction spéciale du protoplasme cellulaire, réaction qui serait en rapport avec la digestion du bacille de Hansen.

IV. — COMPARAISON DE NOS RÉSULTATS

A CEUX OBTENUS PAR L'INJECTION INTRAPÉRITONÉALE D'AUTRES BACILLES ACIDO-RÉSISTANTS.

Les observations que nous venons de résumer peuvent être comparées aux résultats notés par d'autres auteurs qui ont injecté des bacilles tuberculeux ou des bacilles de Stefansky dans le péritoine de cobayes.

Parmi les travaux concernant l'injection intrapéritonéale de bacilles acido-résistants, il faut citer tout d'abord ceux de Metalnikov et de l'un de nous [4], puis ceux de Metalnikov et Sekreleva [5] qui ont opéré avec du BCG. Ces expérimentateurs n'ont poursuivi l'étude de l'exsudat que pendant 7 à 18 jours. Ils ont constaté que la réaction cellulaire était du type mono-

lymphocytaire (polynucléose, puis prédominance des macrophages suivie de lymphocytose). Les bacilles libres disparaissaient de l'exsudat au bout de 2 à 3 jours et l'activité phagocytaire ne durait que 3 à 5 jours. Enfin, l'autophagie se révélait faible. Nous n'avons pas enregistré après l'injection de bacilles lépreux une régularité aussi manifeste dans le comportement des cellules de l'exsudat.

Bernard [4] observe, après l'inoculation de bacilles de Stefansky dans le péritoine de cobayes, que les lymphocytes, d'abord plus nombreux que les polynucléaires, cèdent la place à ces derniers dès la 4^e heure. Au bout de 24 heures, les grands mononucléaires prédominent. Il remarque encore que la phagocytose est exercée par toutes les cellules blanches, mais que, dans les premières heures, ce sont surtout les polynucléaires qui se montrent actifs. Les bacilles de Stefansky semblent exercer une action toxique envers les polynucléaires qui se manifeste par la pycnose des noyaux. La pycnose apparaît également dans les polynucléaires ne contenant pas de bacilles. L'auteur conclut que « les mononucléaires, hôtes habituels des bacilles de Stefansky, finissent par les absorber tous, parfois avec les polynucléaires qui les contiennent ». Les faits notés par cet auteur, qui n'a étudié l'exsudat que pendant 8 jours, sont à peu près semblables à ceux que nous avons constatés. Nous n'avons cependant pas observé la dégénérescence pycnotique des noyaux des polynucléaires. Il se peut que cette dégénérescence soit un phénomène propre à l'inoculation du bacille de Stefansky. Toutefois, dans ces expériences encore, on constate que la réaction cellulaire est du type mono-lymphocytaire et que la destruction des bacilles est surtout due à l'action des macrophages.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

L'injection de bacilles de Hansen dans le péritoine du cobaye provoque toujours dans l'exsudat une poussée de polynucléose, suivie d'une réaction cellulaire du type mono-lymphocytaire avec prédominance, soit des macrophages, soit des lymphocytes. Bien que dans l'ensemble cette réaction montre une régularité marquée, un examen prolongé permet parfois de noter l'apparition de poussées irrégulières de polynucléose. La réaction cellulaire présente à peu près les mêmes caractères à la suite de l'injection de bacilles vivants et de celle de bacilles morts. Cependant, dans certains cas, la polynucléose du début et la mononucléose consécutive sont moins élevées après l'inoculation de bacilles morts.

Les bacilles libres disparaissent assez rapidement de l'exsudat péritonéal, surtout chez les animaux inoculés avec des bacilles morts.

L'action phagocytaire s'accomplit d'abord par les polynucléaires, puis, par les mononucléaires qui jouent le rôle prépondérant. L'intervention des microphages s'interrompt le plus souvent au bout de 24 à 48 heures. Au contraire, des bacilles modifiés et en partie digérés peuvent être découverts dans les macrophages 3 mois encore après l'inoculation.

L'activité phagocytaire des macrophages se manifeste, simultanément avec celle des microphages, 1 h. 30 à 24 heures après l'injection. Elle peut même se révéler intense déjà au bout de quelques heures. La diminution de l'index phagocytaire des macrophages s'observe habituellement au bout de 14 à 20 jours.

Il existe une différence frappante dans l'activité phagocytaire des microphages et des macrophages envers les bacilles morts et les bacilles vivants. On observe, en effet, et ceci invariablement, que la phagocytose se montre intense à la suite de l'injection de bacilles lépreux vivants. Il est assez difficile d'expliquer les raisons de ce comportement différent des phagocytes. On peut supposer que les bacilles vivants exercent un effet chimiotactique plus prononcé que les bacilles tués par la chaleur. Il n'est pas à exclure non plus que les tissus lépromateux contiennent une substance quelconque qui stimule la phagocytose des cellules et qui serait détruite par la chaleur.

L'autophagie leucocytaire, c'est-à-dire la destruction de phagocytes par d'autres phagocytes, commence déjà 7 heures ou, plus souvent, 24 à 48 heures après l'inoculation. Des macrophages englobent dans leur protoplasme des polynucléaires contenant ou non des bacilles. A partir du 3^e jour, l'autophagie s'exerce uniquement sur les mononucléaires. L'intensité de ce phénomène ne se révèle pas plus forte quand l'injection est pratiquée avec des bacilles vivants.

Nos recherches ont démontré que la destruction des bacilles lépreux n'est pas appréciable dans les polynucléaires et lente dans les mononucléaires. Les formes de destruction observées dans les macrophages ressemblent aux divers stades de dégénérescence du bacille de Hansen constatés dans les lésions lépreuses. La digestion et la destruction des germes vivants sont souvent suivies de l'apparition dans le protoplasme cellulaire de « corpuscules réfringents » de nature inconnue, ressemblant à des cristaux. On peut admettre qu'il s'agit soit de produits de désintégration des bacilles, soit d'inclusions cellulaires qui caractérisent une réaction spéciale des macrophages.

Le phénomène de bactériolyse extracellulaire n'a pas été constaté. Toutefois, nous avons observé rarement, au contact immédiat de macrophages, des agglomérations de bacilles paraissant en voie de lyse.

De l'ensemble des faits notés dans ce travail, on peut conclure

que l'immunité naturelle du cobaye envers le germe de la lèpre inoculé dans le péritoine est due à la phagocytose. La destruction des bacilles de Hansen est vraisemblablement parachevée dans certains organes. Cette question appelle des observations nouvelles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. BERNARD. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1934, **27**, 12.
- [2] R. CHAUSSINAND. *Ces Annales*, 1947, **73**, 660.
- [3] S. METALNIKOV et C. TOUMANOFF. *Ces Annales*, 1925, **39**, 22.
- [4] S. METALNIKOV et C. TOUMANOFF. *Ces Annales*, 1925, **39**, 909.
- [5] S. METALNIKOV et SEKRETEVA. *Ces Annales*, 1927, **41**, 301.
- [6] C. TOUMANOFF. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **93**, 1281.

LE VIRUS « COBAYE E. R. »
VIRUS SEPTICÉMIQUE LATENT DU COBAYE
A POTENTIEL NEUROTROPE

par AIMÉ PELLISSIER (*).

(Institut Pasteur de Brazzaville.)

Nous avons relaté, avec J. Ceccaldi et H. Arnoult [1], dans une note préliminaire parue en 1950, l'isolement de ce virus de cobaye à Brazzaville. Nous apportons aujourd'hui l'étude détaillée de ce virus dont nous avons pu reconnaître l'individualité et rectifier le classement primitif.

Au début de l'année 1948, quelques apports étrangers de cobayes ont été faits à l'élevage de l'Institut Pasteur de Brazzaville, en vue de l'augmenter. Nous pensons voir là l'origine de l'introduction du virus chez nos animaux.

Nous n'avons pas constaté d'animaux morts spontanément de la maladie, mais il a suffi parfois d'une inoculation minime pour donner une grande virulence à ce virus latent. Les premières souches isolées furent mises en évidence après inoculation péritonéale de sang de malades fébriles suspects de rickettsiose, puis de broyats de poux de rats capturés dans les cases de ces malades. Nous verrons tout à l'heure que les cobayes présentent dans les monocytes de l'exsudat péritonéal des inclusions cytoplasmiques analogues aux « enclaves rosées » rencontrées dans le typhus, d'où le nom de virus E. R. (virus à enclaves rosées) que nous avons donné à ce virus pour le différencier d'un autre virus de cobaye, également isolé à Brazzaville, et à manifestations pulmonaires. Nous pensions donc à l'époque avoir isolé des souches de rickettsies et nous sommes très reconnaissant à P. Giroud, chef du Service du Typhus à l'Institut Pasteur de Paris, à qui nous avons envoyé nos lames, de nous avoir aiguillé sur la recherche d'un virus de cobaye à cause de l'absence de rickettsies sur les frottis et de l'abondance extraordinaire de ces enclaves rosées.

De fait, nous avons obtenu la même maladie expérimentale par inoculation intrapéritonéale de lait stérilisé.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 juillet 1953.

Nous avons ainsi obtenu 9 souches de ce virus :

4 souches par inoculation de sang . . .	sur 36 cobayes inoculés.
2 souches par inoculation de poux de rats.	sur 6 —
3 souches par inoculation de lait stérile.	sur 24 —

La présence de ce virus latent chez nos cobayes ne s'est manifestée que pendant l'année 1948, dans le courant du premier semestre. Depuis nous ne l'avons plus rencontré.

POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL.

Nous n'avons conservé qu'une souche du virus cobaye E. R. Cette souche a subi 7 passages sur cobaye, par inoculation de cerveau à péritoine, puis 27 passages sur souris de cerveau à cerveau, soit au total 34 passages. L'entretien de ce virus sur cerveau de souris a amené des modifications dans le pouvoir pathogène expérimental et la constitution d'une souche neurotrope. Il convient donc d'étudier les caractères de la souche au début de son isolement, puis les caractères actuels de la souche neurotrope.

1° **POUVOIR PATHOGÈNE AU MOMENT DE L'ISOLEMENT.** — *Cobaye.* — Quelquefois dès le premier passage, toujours dès le second, l'animal fait une maladie mortelle. Après une incubation de deux à trois jours, s'installe une réaction fébrile en plateau à 40-41°. La fièvre dure de six à dix jours et l'animal meurt très rapidement, en hypothermie (fig. 1). L'amaigrissement est rapide et important. La perte de poids est en moyenne du tiers du poids initial. Dès le troisième jour on constate une polynucléose neutrophile à 70-80 p. 100 qui dure jusqu'à la mort.

A l'autopsie, les animaux présentent un exsudat péritonéal filant, plus ou moins important, mais toujours net, et une rate congestionnée et hypertrophiée. Les autres organes ne présentent rien de spécial, et il n'y a pas de lésions pulmonaires. Microscopiquement, on note un peu de congestion et de stase sanguine au niveau du foie et des reins. La rate présente une congestion intense et une forte réaction macrophagique.

Les frottis de péritoine montrent des inclusions situées dans le cytoplasme et le noyau de grands monocytes et de cellules endothéliales. Les affinités tinctoriales de ces inclusions varient avec les passages. Au cours des premiers passages elles sont colorées en bleu foncé par le Giemsa et en rouge vif par le Macchiavello. Puis la coloration au Giemsa se perd et les inclusions apparaissent en quelque sorte en négatif sur le fond bleu du cytoplasme. Le Macchiavello les colore alors en rose et l'aspect est identique aux enclaves rosées du typhus, mais avec une abondance extrême.

Ces inclusions sont arrondies, de tailles inégales, de coloration inégale et sont très nombreuses dans une même cellule.

Tous les organes sont virulents : le cerveau, le foie, la rate, le poumon et le sang. Le maximum de virulence semble exister dans la rate et le cerveau, dont les dilutions à 1/100 000 donnent une maladie expérimentale de moyenne intensité.

Singe. — Deux cercopithèques, inoculés par voie péritonéale,

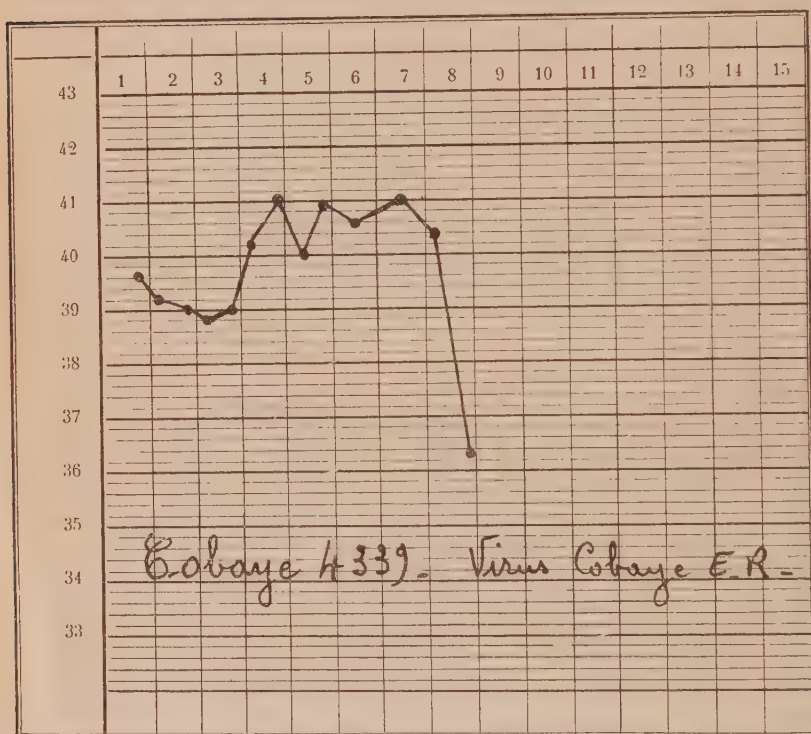


FIG. 1. — Cobaye n° 4339. Virus cobaye E. R. Inoculation péritonéale de sang cobaye filtré sur Seitz. Mort en hypothermie. Rate congestionnée, poumons normaux. Présence d'enclaves rosées.

ont présenté, après une incubation de quatre et de huit jours, une maladie fébrile mortelle en douze et quinze jours. Les animaux ont été sacrifiés agonisants, en hypothermie. L'autopsie a montré une congestion des viscères abdominaux : rein, rate et foie. L'histologie n'a pas décelé de lésions spécifiques.

Lapin. — Deux lapins inoculés dans la chambre antérieure de l'œil n'ont rien présenté. Deux autres, inoculés dans le péritoine,

ont présenté un amaigrissement rapide, sans réaction fébrile, et ont été sacrifiés agonisants, en hypothermie, les quatorzième et vingt et unième jours. L'autopsie n'a rien montré de particulier.

Souris. — Par *inoculation intracérébrale* à la souris d'une émulsion de cerveau de cobaye de passage, nous avons obtenu une méningo-encéphalite transmissible en série constituant la souche neurotrope du virus.

L'*inoculation intrapéritonéale* entraînait la mort de 50 p. 100 des animaux en six à huit jours, avec des signes d'excitation. Les frottis de péritoine montraient de nombreuses enclaves rosées. Les animaux qui guérissaient étaient ensuite immunisés contre une inoculation intracérébrale.

L'*instillation nasale*, sous anesthésie à l'éther, et l'injection intrapulmonaire à la seringue nous avaient donné dans quelques cas une pneumopathie, avec exsudat pleural, et nous avons trouvé, dans deux cas, des éléments colorables au Giemsa et au Macchiavello, analogues aux corps élémentaires de Myiagawa. C'est ce qui nous avait fait penser avoir affaire à un virus du groupe ornithose-lymphogranulomatose.

Rats. — Quatre rats blancs inoculés dans le péritoine n'ont présenté aucune réaction.

2° **POUVOIR PATHOGENE DE LA SOUCHE NEUROTROPE.** — *Souris.* — Dès les premiers passages sur cerveau de souris la maladie expérimentale s'est fixée et n'a pas varié depuis. Il y a une période d'incubation de six jours absolument sans aucun symptôme. Le septième jour apparaissent des signes nerveux, de l'excitation, des soubresauts, des tics, des convulsions. C'est au cours d'une crise convulsive que l'animal meurt, le dos voûté et les pattes postérieures en extension. Ce sont les signes cliniques habituels de la méningo-encéphalite chez la souris. De fait, l'histologie montre une méningo-encéphalite à cellules rondes et quelques polynucléaires. Il n'y a pas d'inclusions.

Après 33 passages de cerveau à cerveau, le pouvoir pathogène expérimental est devenu le suivant :

Chez la souris les inoculations sous-cutanées, intrapéritonéales et intranasales sont actuellement sans aucun effet.

Chez le *rat* et le *lapin* inoculés par voie intrapéritonéale et par voie intracérébrale, on ne constate aucun pouvoir pathogène.

Singe. — L'inoculation intrapéritonéale est sans effet, par contre l'inoculation intracérébrale détermine une méningo-encéphalomyélite fébrile, avec paraplégie, mortelle en onze jours. L'histologie montre des lésions banales de méningo-encéphalo-

myélite diffuse, sans caractères de spécificité histologique et sans inclusions.

Chez le *cobaye*, enfin, la souche neurotrope a conservé son pouvoir pathogène original et deux animaux inoculés dans le péritoine ont fait la maladie fébrile mortelle, avec enclaves rosées dans les cellules endothéliales de l'exsudat péritonéal.

En résumé la souche neurotrope, capable de donner encore chez le cobaye la maladie originale, n'est plus pathogène que pour la souris et le singe par voie intracérébrale.

OEUF EMBRYONNÉ. — Le virus cobaye E. R. cultive sur embryon de poulet. Nous avons seulement pratiqué l'inoculation dans le sac vitellin, selon la méthode aveugle classique. Les trois premiers passages ont été à peu près des passages aveugles. A partir du quatrième la mortalité a commencé à se régulariser et au neuvième passage nous avons obtenu la mort de 3 embryons sur 4 les sixième et septième jours. Les lésions histologiques ne présentent aucun caractère particulier. Il s'agit seulement de congestion diffuse et de petites hémorragies au niveau de l'embryon et des membranes. Il n'y a pas d'inclusions spécifiques, ni de corps élémentaires.

Après 5 passages sur œuf, le virus a été retransmis avec succès à la souris, donnant la maladie expérimentale typique.

CARACTÈRES DU VIRUS.

Filtration. — Deux expériences de filtration de la souche au début de son isolement ont été réussies par filtration de sang de cobaye sur filtre Seitz.

Activité. — Nous avons vu que la souche normale pouvait être passée avec une dilution à 1/100 000 de cerveau ou de rate de cobaye. La souche neurotrope est beaucoup plus active et la dose DL50 pour la souris est obtenue avec une dilution du virus à 1/500 000.

Conservation. — Les cerveaux virulents se conservent pendant plusieurs mois à -25° (au moins quatre mois) et pendant au moins dix jours à $+10^{\circ}$. Avec le procédé assez rudimentaire de dessiccation dans le vide que nous employons, procédé décrit avec l'étude du virus *Allenopithecus* [2], nous obtenons une bonne conservation du virus après une exposition de quatorze jours à la température du laboratoire, c'est-à-dire $+25^{\circ}$ à $+30^{\circ}$.

Résistance. — Il s'agit d'un virus très résistant, qui n'est détruit qu'après deux heures de chauffage à 60° et cinq minutes à 100° . Les antiseptiques, formol à 5 p. 1 000 et l'acide phénique à 10 p. 1 000, le détruisent en quelques heures.

ETUDE IMMUNOLOGIQUE.

Pour l'identification immunologique du virus cobaye E. R., nous l'avons comparé à 32 autres virus neurotropes, à savoir :

Virus locaux isolés en A.E.F.	4
Virus isolés en Afrique tropicale	10
Virus isolés en Amérique tropicale	4
Virus neurotropes divers	14

La liste de ces virus figure dans les tableaux I et II, et pour les caractéristiques de chacun d'eux nous renvoyons à notre étude immunologique du virus encéphalomyélitique de Brazzaville [3].

Nous avons utilisé, d'une part, les épreuves de séro-neutralisation croisée et, d'autre part, les épreuves de fixation croisée du complément. Pour les techniques utilisées, nous renvoyons à nos communications précédentes [3, 4].

Les épreuves de séro-neutralisation croisée pratiquées chez la souris vis-à-vis de 10 DL50 de chaque virus n'ont montré aucune relation immunologique entre le virus cobaye E. R. et les 32 autres virus auxquels il a été comparé. Le tableau I donne les résultats de la séro-neutralisation du virus cobaye E. R. par les anti-sérums expérimentaux des autres virus. Le tableau II donne les résultats de la séro-neutralisation des 32 autres virus par l'anti-sérum cobaye E. R. Il convient d'y ajouter l'épreuve sur 2 singes avec le virus de l'encéphalomyélite de Brazzaville.

Avec les épreuves de la fixation croisée du complément, nous n'avons de même trouvé aucune relation immunologique entre le virus cobaye E. R. et les divers autres virus. Rappelons que parmi les virus étudiés se trouvaient les virus de la méningo-pneumonie et celui de la lymphogranulomatose vénérienne, tous deux membres du groupe des Myiagawella. On sait que les virus de ce groupe déterminent la formation d'un anticorps commun fixant le complément. Or, les résultats négatifs que nous avons obtenus entre ces deux virus et le virus cobaye E. R. permettent de conclure que ce dernier virus ne fait pas partie de ce groupe.

DISCUSSION.

Nous avons vu que lors des expériences de début nous avions obtenu à deux reprises chez la souris, par instillation nasale ou inoculation intrapulmonaire, une pneumopathie avec présence de corps élémentaires dans des cellules endothéliales. Nous avions alors pensé avoir affaire à un virus du groupe des Myiagawella (psittacose, ornithose, lymphogranulomatose).

Or, par la suite, nous n'avons plus retrouvé ce pouvoir pathogène par voie nasale chez la souris. Nous avons constaté de plus l'absence de corps élémentaires sur les frottis de sac vitellin des

TABLEAU I. — Épreuves de séro-neutralisation
du virus cobaye E.R.

: ANTI-SERUMS	: Virus Cobaye E.R. (Actif à 1/500.000)				
	: 1000	: 500	: 100	: 10	: 1
	: DL50	: DL50	: DL50	: DL50	: DL50
: Sérum de lapin normal...	:	:	:	:	2/4
: Virus d'A.E.F.	:	:	:	:	:
: Encéphalomyélite Brazza.	:	:	:	0/4	:
: Allenopithecus.....	:	:	:	0/4	:
: Cobaye E.R.....	1/4	3/4	4/4	4/4	:
: Cobaye Pulmonaire.....	:	:	:	0/8	:
: Ictère épidémique.....	:	:	:	0/4	:
: Afrique tropicale.	:	:	:	:	:
: Fièvre jaune.....	:	:	:	1/4	:
: Rift Valley Fever.....	:	:	:	0/4	:
: Bwamba Fever.....	:	:	:	0/4	:
: Nil Ouest.....	:	:	:	1/4	:
: Semliki Forest.....	:	:	:	0/4	:
: Bunyanwera.....	:	:	:	0/4	:
: N'Taya.....	:	:	:	0/4	:
: Mengo.....	:	:	:	0/4	:
: Zika.....	:	:	:	0/4	:
: Uganda S.....	:	:	:	1/4	:
: Amérique tropicale.	:	:	:	:	:
: Anopheles A.....	:	:	:	0/4	:
: Anopheles B.....	:	:	:	0/4	:
: Wyeomyia.....	:	:	:	0/4	:
: Ilheus.....	:	:	:	0/4	:
: Virus divers.	:	:	:	:	:
: Encéphalomyocardique....	:	:	:	0/4	:
: E.M.A. de l'EST.....	:	:	:	0/4	:
: E.M.A. de l'OUEST.....	:	:	:	1/4	:
: E.M.A. du VENEZUELA.....	:	:	:	0/4	:
: Encéphal. SAINT LOUIS...	:	:	:	0/4	:
: Encéphal. JAPONNAISE B ..	:	:	:	0/4	:
: Encéphal. RUSSE.....	:	:	:	0/4	:
: Louping Ill.....	:	:	:	0/4	:
: Polio. Lansing.....	:	:	:	0/4	:
: Polio. M.E.F. I.....	:	:	:	0/4	:
: THEILER GD VII.....	:	:	:	0/4	:
: Chorio-méning. Lymphocyt.	:	:	:	0/4	:
: Méningo-Pneumonie.....	:	:	:	0/4	:
: Nicolas-Favre.....	:	:	:	0/4	:

Numérateur = souris vivantes

Dénominateur = souris inoculées

embryons inoculés avec le virus. Nous avons constaté enfin l'absence de fixation croisée du complément entre le virus cobaye E. R. et les deux virus du groupe Myiagawella étudiés. Nous devons donc conclure que le virus cobaye E. R. n'appartient pas à ce groupe de virus, et que nous avons rencontré, au début

TABLEAU II. — Épreuves de séro-neutralisation de divers virus par l'anti-sérum cobaye E.R.

VIRUS	Ino-: :cula: Activité :tion:	: Nombre DL50 : neutralisées: Cobaye E.R. : par le sérum: vis-à-vis de : homologue : IODL 50 :
<u>Virus d'A.E.F.</u>		
: Allenopathicus.....	: I.C.: I/10.000	: 100 : 0/4 :
: Cobaye E.R.....	: I.C.: I/500.000	: 500 : 4/4 :
: Cobaye Pulmonaire.....	: I.C.: I/200.000	: 1000 : 0/4 :
: Ictère épidémique.....	: I.C.: I/600.000	: 1000 : 0/4 :
: Afrique tropicale.		
: Amaril DAKAR.....	: I.C.: I/800.000	: 1000 : 0/4 :
: Rift Valley Fever.....	: I.C.: I/50 millions:	: 1000 : 0/4 :
: Bwamba Fever.....	: I.C.: I/200.000	: 1000 : 0/4 :
: Nil Ouest.....	: I.C.: I/10 millions:	: 500 : 0/4 :
: Semliki Forest.....	: I.P.: I/20 millions:	: 1000 : 0/4 :
: Bunyanwera.....	: I.C.: I/5 millions :	: 500 : 0/4 :
: N'Taya.....	: I.C.: I/800.000	: 500 : 0/4 :
: Mengo.....	: I.P.: I/30 millions:	: 1000 : 1/4 :
: Zika.....	: I.C.: I/1 million :	: 500 : 0/4 :
: Uganda S.....	: I.C.: I/400.000	: 1000 : 0/4 :
: Amérique tropicale.		
: Anopheles A.....	: I.C.: I/300.000	: 500 : 0/4 :
: Anopheles B.....	: I.C.: I/300.000	: 500 : 0/4 :
: Wyeomyia.....	: I.C.: I/800.000	: 500 : 0/4 :
: Ilheus.....	: I.C.: I/20 millions:	: 500 : 0/4 :
: Virus divers.		
: Encéphalomyocardique....	: I.P.: I/20 millions:	: 1000 : 0/4 :
: E.M.A. de l'EST.....	: I.C.: I/100millions:	: 500 : 0/4 :
: E.M.A. de l'OUEST.....	: I.C.: I/100millions:	: 500 : 0/4 :
: E.M.A. du VENEZUELA.....	: I.C.: I/50 millions:	: 1000 : 0/4 :
: Encéphal.SAINT LOUIS....	: I.C.: I/100millions:	: 1000 : 0/4 :
: Encéphal.JAPONNAISE B ..	: I.C.: I/50 millions:	: 1000 : 0/4 :
: Encéphal.RUSSE.....	: I.C.: I/100millions:	: 500 : 0/4 :
: Louping Ill.....	: I.C.: I/8 millions :	: 500 : 0/4 :
: Polio. Lansing.....	: I.C.: I/600	: 50 : 1/4 :
: Polio. M.E.F. I.....	: I.C.: I/600	: 50 : 1/4 :
: THEILER GD VII.....	: I.C.: I/50 millions:	: 100 : 0/4 :
: Chorio-méning.Lymphocyt..	: I.C.: I/500.000	: 500 : 0/4 :
: Méningo-Pneumonie.....	: I.C.: I/500.000	: 500 : 1/4 :
: Nicolas-Favre.....	: I.C.: I/50.000	: 500 : 0/4 :

Numérateur = souris vivantes
I.C. = intracérébrale

Dénominateur = souris inoculées
I.P. = i, trapéritonéale.

de nos expériences sur la souris, un virus latent de la souris, du groupe des Myiagawella et à manifestations pulmonaires. Nous n'avons malheureusement pas conservé cette souche poumon-souris, mais divers virus semblables ont déjà été décrits. R. Gönnert [5, 6, 7] a isolé et décrit en 1941 un virus latent de souris, transmissible uniquement par voie nasale, mis en évidence

à l'occasion de passage du virus de l'ectromélie. K. Heinzmann [8], également en 1941, au cours de recherches sur la rougeole, a isolé un virus uniquement transmissible par voie nasale, mais pathogène pour la souris et le rat. Enfin, C. Nigg [9] isolait et étudiait avec Eaton [10] le virus de la pneumopathie de la souris, rencontré à l'occasion de recherches sur la grippe et pathogène pour la souris uniquement par voie nasale.

On voit donc que la rencontre d'un virus latent de la souris, du groupe des Myiagawella, est loin d'être exceptionnelle et nous regrettons seulement de ne pas avoir conservé cette souche.

Le virus cobaye E. R. est donc différent des divers virus neurotropes auxquels nous l'avons comparé. Mais parmi ces virus figure un seul virus de cobaye, le virus « cobaye pulmonaire » qui est un autre virus local, isolé à Brazzaville, et dont l'étude fera l'objet de la communication suivante. D'autres virus isolés chez le cobaye ont cependant été décrits, mais les souches n'en ont pas été conservées et nous devons nous en tenir à la description parfois incomplète donnée par les auteurs. Il est d'ailleurs assez difficile de préciser s'il s'agit de plusieurs virus différents ou si plusieurs descriptions se rapportent à un même agent pathogène (P. Lépine [11]).

En 1911, Roemer [12] décrivait une maladie transmissible du cobaye se présentant cliniquement comme la poliomyélite. La maladie évoluait suivant une phase prodromique de fièvre et d'amaigrissement, à la suite de laquelle apparaissait une paralysie flasque et soudaine. L'histologie montre une méningo-encéphalomyélite à prédominance lymphocytaire. Il s'agit là d'un virus indiscutablement différent du virus cobaye E. R.

En 1913, Gasperi et Sangiorgi [13] décrivent sous le nom de peste du cobaye à virus filtrable une maladie dont l'histologie pathologique est analogue à la maladie de Roemer, avec des différences cliniques, présence du virus dans le sang des cobayes, et expérimentales, sensibilité du lapin par voie intraveineuse. Il est précisé que la souris n'est pas réceptive. Il semble donc bien qu'il s'agit d'un virus différent de celui qui nous occupe.

Bien différent est le virus décrit en 1921 par Jonesco-Mihaiesti [14] et mis en évidence à l'occasion de l'inoculation de sang de *M. rhesus*. Il s'agit d'une maladie septicémique cliniquement analogue à celle déterminée par le virus cobaye E. R. : même incubation, même courbe fébrile, même amaigrissement considérable et mort en hypothermie. Les lésions constatées à l'autopsie semblent cependant différencier les deux virus. On observe, en effet, une dégénérescence hépatique avec foyers de nécrose blanchâtre, une hypertrophie des ganglions et des surrénales qui atteignent un volume considérable. De telles lésions ne sont pas constatées avec le virus cobaye E. R.

On sait, en outre, que le virus de la chorio-méningite lymphocytaire est susceptible de se manifester chez le cobaye sous forme d'une affection fébrile à manifestations pulmonaires et transmissible en série (P. Lépine et V. Sautter [15], G. Blanc [16]). Le virus de la chorio-méningite lymphocytaire fait partie des virus auxquels nous avons comparé le virus cobaye E. R., et nous avons vu qu'il n'y a aucune relation immunologique entre eux.

Nous avons enfin isolé un autre virus de cobaye à manifestations pulmonaires, que nous avons appelé : virus cobaye pulmonaire. Ce virus fait l'objet de la communication suivante. Il a été inclus dans toute l'expérimentation et il n'y a aucune relation immunologique entre ces deux virus de cobaye.

CONCLUSIONS.

Nous avons isolé, à l'occasion d'inoculations diverses, un virus latent de cobaye dont la virulence a été très rapidement exaltée par passages de cobaye à cobaye. Il s'agit d'un virus septicémique donnant une maladie fébrile mortelle caractérisée par la présence d'inclusions dans les cellules endothéliales de l'exsudat péritonéal. Ces inclusions, colorables en rose par le Macchia-vello, présentent des analogies avec les « enclaves rosées » du typhus expérimental du cobaye. Ces inclusions caractérisent le virus, qui est ainsi appelé : virus cobaye E. R., pour le différencier d'un autre virus de cobaye également isolé à Brazzaville.

Nous avons obtenu, par passage de cerveau à cerveau, une souche neurotrope chez la souris qui détermine une méningo-encéphalite régulièrement mortelle en six à huit jours. Le singe fait une méningo-encéphalomyélite mortelle après inoculation cérébrale.

Après 33 passages de cette souche neurotrope, nous avons obtenu chez le cobaye, par inoculation intrapéritonéale, la maladie fébrile mortelle originale avec présence d'enclaves rosées dans les cellules endothéliales de l'exsudat péritonéal.

Par les épreuves de séro-neutralisation croisée et les épreuves de fixation croisée du complément nous avons comparé le virus cobaye E. R. à 32 autres virus neurotropes. Aucune relation immunologique n'a été décelée entre ces divers virus et le virus que nous étudions.

Le virus cobaye E. R. apparaît également comme différent des quelques virus de cobaye qui ont été décrits, mais dont les souches n'ont pas été conservées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. FELLISSIER, J. CECCALDI et H. ARNOULT. Ces *Annales*, 1950, 79, 200.

- [2] A. PELLISSIER. *Ces Annales*, 1953, **85**, 593.
- [3] A. PELLISSIER. *Ces Annales (sous presse)*.
- [4] A. PELLISSIER. *Ces Annales (sous presse)*.
- [5] R. GÖNNERT. *Zentralbl. Bakt.*, 1941, **147**, 161.
- [6] R. GÖNNERT. *Klin. Wochenschr.*, 1941, **20**, 76.
- [7] R. GÖNNERT. *Zentralbl. Bakt.*, 1942, **148**, 331.
- [8] K. HEINZMANN. *Klin. Wochenschr.*, 1941, **20**, 910.
- [9] CLARA NIGG. *Science*, 1942, **93**, 49.
- [10] C. NIGG et M. D. EATON. *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 497.
- [11] P. LÉPINE. *Maladies des cobayes* in C. LEVADITI, P. LÉPINE et J. VERGE, *Les ultravirus des maladies animales*. Maloine édit. Paris, 1943.
- [12] P. H. ROEMER. *Deut. med. Wochenschr.*, 1911, **37**, 1209.
- [13] F. DE GASPERI et G. SANGIORGI. *Zentralbl. Bakt.*, 1913, **71**, 257.
- [14] JONESCO-MIHAIESTI. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, 1014.
- [15] P. LÉPINE et M^{lle} V. SAUTTER. *Ces Annales*, 1945, **71**, 103.
- [16] G. BLANC. *Semaine des Hôpitaux*, 1952, **28**, 3805.

LE VACCIN CONTRE LA FIÈVRE JAUNE

PRÉPARÉ PAR L'INSTITUT PASTEUR DE DAKAR

par R. A. HUSSON et R. KOERBER. (*).

(Institut Pasteur de Dakar.)

I. — HISTORIQUE.

La souche dite « française » a été recueillie sur un jeune Syrien atteint brutalement d'une affection faisant soupçonner le diagnostic, qui devait se confirmer, de fièvre jaune. Le malade, cependant, guérissait.

A la vingtième heure de sa maladie, du sang fut prélevé et des *Stegomyia* d'élevage gorgés sur lui.

Le sang fut inoculé à un premier *M. rhesus* qui mourut huit jours plus tard.

Les *Stegomyia* furent nourris vingt-quatre jours après le repas infectant sur un deuxième *M. rhesus* qui mourut six jours après, puis le cinquante-deuxième jour, sur un troisième *M. rhesus* qui mourut cinq jours après [1].

Les viscères des singes agonisants furent broyés et, en partie, utilisés pour des passages destinés à l'entretien de la souche sur *M. rhesus*, en partie, congelés et mis, par Sellards et Laigret, à la disposition des différents laboratoires [2, 3].

Adaptation. — En 1930, Theiler découvrit que l'inoculation intracérébrale de ce virus tuait par encéphalite la souris suisse en trois ou quatre jours. Des passages en série de cerveau à cerveau [4] développèrent le neurotropisme du virus, qui n'en perdit point pour autant la totalité de ses affinités viscérales. Il produit encore des lésions viscérales chez le hérisson [5]. Son passage en série chez le singe de foie à foie peut lui restituer son viscérotropisme original [6]. Eventuellement, ce retour est spontané [7]. Cependant inoculé sous la peau de *M. rhesus*, il lui confère, après maladie plus ou moins apparente, jamais mortelle, une solide immunité.

Le vaccin. — Cette dernière propriété a immédiatement orienté les recherches en vue de la vaccination humaine sur l'emploi de cette souche. Elle fut d'abord inoculée simultanément avec de

(*) Manuscrit reçu le 8 juillet 1953.

l'antisérum humain [5], puis seule, après tentative d'atténuation [10 à 14]. Cependant, la virulence demeurait mal maîtrisée. Peltier, qui, à Dakar, étudiait la pénétration à travers la peau du virus à son 238^e passage, enregistra, en 1938, des résultats fort satisfaisants. En 1939 [15], il proposa la vaccination des humains sous sa forme actuelle, combinée ou non avec la vaccine. La méthode fut d'autant plus largement utilisée que les circonstances en vinrent rapidement à exiger une action vigoureuse et massive.

En 1940, 400 000 sujets avaient déjà été vaccinés ; sur 496 d'entre eux, le contrôle d'immunité par le test de séro-protection, pratiqué avant et après vaccination, démontrait, chez 95 p. 100, l'acquisition d'anticorps neutralisants.

Le 10 décembre 1941, cette vaccination fut rendue obligatoire sur le territoire de l'A. O. F.

En 1944, 11 000 000 d'habitants avaient subi cette vaccination. Le pourcentage des immunités acquises se maintenait à 95 p. 100 sur 2 490 contrôles. La reconnaissance du vaccin par les autorités internationales fut alors sollicitée.

Comparaison avec le 17 D. — Déjà en 1944, à l'occasion du séjour d'un détachement militaire britannique, un essai comparatif avait établi la supériorité antigénique du vaccin de Dakar sur le 17 D qui n'avait conféré que 81,6 p. 100 d'immunités. En 1945, l'U. N. R. R. A. confia à une Commission internationale le soin d'une expérience à faire sur 600 militaires français n'ayant jamais quitté la métropole :

200 (constituant le groupe A) furent inoculés par scarification du vaccin neurotrope de cerveau de souris.

200 (groupe B) furent scarifiés avec le mélange de vaccin neurotrope et de vaccine.

200 (groupe C) furent inoculés sous la peau avec le virus de culture 17 D.

Les épreuves de séro-protection effectuées avec le sang prélevé trente-cinq jours après vaccination montrent 98,94 p. 100 d'immunités acquises dans le groupe A, 97,3 p. 100 dans le groupe B, contre 64,29 p. 100 dans le groupe C.

Sur le rapport de la Commission, le vaccin de Dakar fut validé pour l'établissement des certificats internationaux, le 11 septembre 1946, par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Il est acquis, actuellement, grâce à une expérience enrichie chaque jour, que si au moins en dehors de la race noire, le vaccin de Dakar suscite des réactions plus fréquentes et parfois plus intenses que le 17 D, il conserve l'avantage de sa facilité d'application et de la possibilité de s'associer au vaccin anti-variolique dans la vaccination massive des populations laborieusement rassemblées et peu accessibles.

Il ne faudrait point, pour autant, penser que les règles (voir plus bas) de sa préparation et son emploi tolèrent un manque de rigueur. Récemment, en Honduras et à Costa-Rica, où il avait été choisi pour une vaccination systématique en région particulièrement difficile, des échecs furent signalés conjointement à des réactions à forme d'encéphalite chez les enfants. L'explication fut donnée par Soper de ces faits exceptionnels : « les mauvaises conditions d'utilisation du vaccin » [17].

L'expérience, si nous considérons uniquement l'A. O. F. et le Togo, porte actuellement sur plus de 42 000 000 de vaccinés ou revaccinés, dont plus de 110 000 sujets de race blanche. Elle montre que les réactions sont sans gravité.

Cela résulte également de l'enquête faite dans la République du Panama (1949), où 24 000 personnes furent vaccinées avec le vaccin de Dakar par un « personnel choisi et particulièrement exercé ». Durant la période consécutive à la vaccination, on ne constata ni réactions graves, ni décès, ni cas de fièvre jaune chez les sujets vaccinés. D'autre part, 150 échantillons prélevés au hasard six semaines après la vaccination donnèrent un test de séro-protection positif.

Plus récemment encore, une enquête particulièrement minutieuse a été faite par le Laboratoire de la Santé Maritime à Alger. Basée sur les réponses écrites à un questionnaire détaillé remis à chaque vacciné, cette enquête fait état de 1 000 réponses reçues sur 1 599 vaccinations pratiquées avec le vaccin de Dakar de 1949 à 1952. Dans les conclusions on note : « Les symptômes rapportés par nos 1 000 correspondants ne paraissent jamais graves ».

Dès 1948, au Congrès de Washington, Peltier [16] avait reconnu, et il n'y a rien à y ajouter aujourd'hui, deux types de réaction :

Précoce (cinquième et sixième jours, 10 à 15 p. 100 des cas) caractérisée par un état fébrile, de la courbature et de la céphalée pendant vingt-quatre à quarante-huit heures ;

Tardive (douzième à quinzième jour, exceptionnelle), de type méningo-encéphalitique pendant cinq à six jours.

Contre-indications. — A ce même Congrès, Peltier conseillait de ne point vacciner les sujets souffrant d'une atteinte hépatique ou rénale, de même que les enfants chétifs ou ayant présenté une fièvre éruptive, dans un passé récent.

Durieux a fixé les contre-indications de la vaccination anti-amarile de la façon suivante :

... Les contre-indications sont les mêmes que pour les autres vaccinations (contre la variole, la typhoïde, la diphtérie, le tétanos, etc.).

La vaccination des enfants de moins de 2 ans est déconseillée.

Il y a lieu de surseoir à la vaccination des enfants de moins de 10 ans, dans les régions où des maladies à virus ont été constatées récemment (oreillons, rougeole, encéphalite, etc.).

Dans les grands centres de vaccination, où les conditions de conservation et d'application du 17 D sont réalisées, celui-ci est appliqué aux personnes présentant une contre-indication au vaccin neurotrope (contre-indication d'âge ou d'état de santé).

II. — PRÉPARATION DU VACCIN.

Souris. — A partir d'un lot reçu du laboratoire de Lagos (Nigeria), un élevage de souris albinos a été constitué dans une ferme située dans la banlieue de Dakar à M'Bao. L'effectif oscille entre 5 000 et 7 500 et fournit chaque année environ 15 000 sujets utilisés quand ils atteignent le poids de 17 g, c'est-à-dire vers l'âge de 2 mois 1/2.

Virus. — Il est représenté par du cerveau de souris aux 258, 259, 260° passages en série. Les lots pour inoculations, distincts des lots de vaccin, préparés en vue de raréfier les passages, doivent subvenir aux besoins de plusieurs années. C'est ainsi que le 258° passage a été fait le 12 novembre 1945, le 259° le 31 mars 1947, le 260°, le 10 septembre 1951. Un nouveau lot a été préparé le 1^{er} mai 1952 en inoculant 48 souris de virus au 258° passage. Dix cerveaux ont été rejetés, correspondant soit à des souris mortes prématurément ou tardivement, soit à des souillures bactériennes. Les 38 cerveaux récoltés, constituant un 259° passage, ont été desséchés sous vide à -20° ; en tubes individuels, scellés ensuite sous vide. Un de ces tubes a été ouvert au moment du besoin et le cerveau grossièrement fragmenté au mortier et réparti à raison de deux mesures par ampoule. Cette mesure en forme de curette contient une quantité de matériel équivalente au 1 : 10 d'un cerveau entier.

Durieux a établi que les cerveaux de souris de son élevage pesant 0,394 g à l'état frais sont réduits à 0,095 g par la dessiccation dans les conditions décrites plus loin, à propos du vaccin.

Les ampoules contenant donc 1 : 5 de cerveau sont déshydratées puis scellées sous vide, étiquetées de rouge et conservées à -20° .

Technique d'inoculation. — Chaque lundi, jeudi et samedi vers 9 heures, 90 souris sont inoculées en vue de la production du vaccin. Une de ces ampoules est ouverte en deux temps pour éviter la projection par rentrée d'air. Le contenu, vidé dans un mortier, est broyé avec 4 cm³ d'eau salée à 0,8 p. 100 ajoutée progressivement. Une seringue de 0,5 est remplie directement au mortier et sert pour inoculer 18 souris. Celles-ci, qui ont été apportées le matin même de M'Bao, sont présentées par un aide qui passe sur leur crâne un tampon d'alcool iodé. L'opérateur

leur fait, dans l'hémisphère cérébral droit, une injection de 0,03 et les met dans les bocal d'observation à raison de 9 souris par bocal. Les 10 bocaux ont été étiquetés à l'avance.

Doses d'inoculation. — Le matériel utilisé pour l'inoculation appartient à un lot de cerveaux qui tuent 6 souris sur 6 à la dilution 10^{-6} . Employé au 1 : 50, l'inoculum contient donc au moins $\frac{10^6}{50} = 20\,000$ doses mortelles.

Récolte. — Les quatrième et cinquième jours après l'inoculation, les souris sont examinées une à une, deux fois par jour, pour dépister les paralytiques. L'absence d'accrochage des pattes quand l'animal est posé sur le rebord du bocal indique les souris à sacrifier. Sont rejetées toutes celles qui meurent avant le quatrième ou après le cinquième jour, ainsi que celles trouvées mortes pendant les deux jours de récolte. Seules, les paralysées vivantes sont utilisées. Elles sont sacrifiées au chloroforme et le cerveau prélevé stérilement dans une pièce à 24° C où l'humidité est ramenée à 50 p. 100 (les conditions climatiques habituelles à Dakar étant en général 30° C et 80 p. 100).

Un opérateur entraîné prélève 12 à 15 cerveaux à l'heure. L'effectif de 80 à 90 souris par récolte nécessite deux opérateurs à raison de deux séances par jour pendant deux jours. Les cerveaux, à mesure qu'ils sont prélevés, sont placés dans un tube individuel numéroté, tandis qu'un tube de bouillon, portant le même numéro, est ensemencé avec un fragment de bulbe rachidien prélevé au crochet de platine. Les tubes de cerveaux sont maintenus dans la glace jusqu'à la fin de la séance, puis portés dans le réfrigérateur à — 20°.

Dessiccation. — Elle débute le sixième jour après l'inoculation, immédiatement après la quatrième séance de récolte. Les cerveaux, dans leurs tubes bouchés au coton et au papier, sont mis dans une cloche garnie d'actigel et refroidie à — 20°.

Deux fois par jour et jusqu'au neuvième jour, le vide est complété dans la cloche maintenue au réfrigérateur.

Le cerveau prend l'apparence d'une noisette. Son poids se réduit des 4 : 5, les contrôles bactériologiques qui ont été mis à l'étuve le soir du cinquième jour sont cependant devenus lisibles et les cerveaux correspondant aux bouillons souillés sont écartés.

Broyage. — Il se fait dans la pièce stérile. On verse toute la récolte dans un mortier : à l'aide d'un pilon lourd, on fait un premier broyage réduisant les cerveaux en poudre. Avant de passer au temps suivant, on ensemence un bouillon et une gélose inclinée. Puis on parfait la pulvérisation au pilon léger, cependant qu'on ajoute la célite (terre d'infusoire) à raison de 0,25 pour 3 cerveaux. La célite, qui accroît le volume et facilite

le glissement du vaccin sur les parois de verre, est conservée dans le vide sur actigel pour la déshydrater le mieux possible.

A la fin de cette opération, le mélange est réduit en poussière impalpable. Un nouveau contrôle bactériologique, de ce qui est maintenant le vaccin définitif, est fait sur bouillon et gélose. Une répartition provisoire en tubes maintenus à -20° sous vide avec l'actigel permet d'attendre la lecture de ces deux contrôles.

Répartition. — Cette opération finale a lieu le onzième jour après l'inoculation. Elle se fait dans la cage de verre en usage pour les cultures de tissus. Elle consiste à introduire dans chaque ampoule une mesure de vaccin correspondant à 1 : 10 de cerveau.

Un dernier contrôle bactériologique sur bouillon et gélose assure la stérilité du vaccin avant le scellage des ampoules, le douzième jour sur rampe à vide.

Conservation. — Les ampoules étiquetées à la machine sont stockées à $+4^{\circ}$. L'expédition par voie aérienne ou terrestre, à condition que la durée totale du transport n'excède par dix jours, peut être faite sans précautions spéciales ; le vaccin doit être replacé à $+4^{\circ}$ aussitôt que possible après réception. Le rapport de 1942 donne un exemple de la résistance du vaccin aux conditions climatiques des tropiques. La date limite d'emploi du vaccin est fixée à deux mois.

Mode d'emploi. — Les 100 doses de vaccin contenues dans une ampoule sont versées dans un mortier de verre et mélangées à 2 cm³ de solution de gomme arabique au 1 : 3 dans de l'eau phosphatée ajustée à pH 7,2. Le vaccin réhydraté est valable une heure. La vaccination est pratiquée à la face externe du bras par 3 scarifications de 6 à 8 mm à travers chacune des III gouttes déposées avec le vaccino-stylet à quelques centimètres les unes des autres.

III. — CONTRÔLES.

Nous avons vu qu'en cours de fabrication, 4 contrôles bactériologiques ont séparé les différentes étapes dont chacune n'est entreprise que si la précédente a prouvé l'absence de souillure bactérienne.

Ils ont porté : 1° sur le cerveau frais ; 2° sur la poudre de cerveau ; 3° sur le mélange cerveau-célite en vrac ; 4° sur le vaccin au moment de sa répartition.

Des contrôles occasionnels portent sur la pureté du virus (inoculations à d'autres animaux) et sur son innocuité (inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale au singe sensible) plus particulièrement au moment de la préparation des lots d'inoculation.

Mais le vaccin proprement dit est constamment surveillé par des titrages mensuels.

IV. — TITRAGE DU VACCIN.

A cet effet, on réserve 8 ampoules du dernier lot fabriqué dans le mois. Deux sont titrées immédiatement, 2 après trente jours d'exposition à température ambiante, 2 après soixante jours de cette même exposition. En d'autres termes, dans les premiers jours de chaque mois, un même titrage porte sur 3 lots de vaccin préparés à un mois d'intervalle et dont le plus récent date de quelques jours.

On confirme ainsi la validité de deux mois, en exposant ce vaccin aux pires conditions de conservation.

Deux ampoules enfin sont conservées dans les conditions ordinaires de stockage en vue d'un contrôle éventuel.

Technique du titrage. — Dans la pièce stérile, on prépare 80 cm³ de dilution à 1 : 10 de sérum normal de cheval en eau salée maintenue à 0°. On en distribue 4,5 cm³ dans 12 tubes bouchés au coton qui seront reportés à la glacière durant chaque temps mort.

On ouvre d'abord les deux ampoules du vaccin le plus ancien (soixante jours) que l'on émulsionne au mortier avec 8 cm³ de sérum dilué. Cette suspension mère est à 1 : 100. En effet, chacune des deux ampoules contient 1 : 10 de cerveau qui, frais, pesait 0,4 g.

Les dilutions décimales 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ sont préparées en reportant 0,5 du tube précédent dans le suivant.

On inocule 0,03 de chacune des quatre dernières dilutions dans le cerveau de 6 souris, soit 24 souris pour le vaccin. On répète l'opération avec le vaccin de trente jours et avec le vaccin frais, mais en inoculant seulement les trois dernières dilutions, soit 18 souris par vaccin ; au total, 60 souris qui, réparties en 10 bocal de 6 (1 par dilution), seront observées quinze jours. Une feuille d'observation par vaccin relate les paralysies et les décès.

Interprétation. — Le vaccin tue, dans la règle, 5 ou 6 souris sur 6 à la dilution 10⁻⁶.

Ceci exprime que 0,03 cm³ de dilution 10⁻⁶ contient au moins une dose minima mortelle.

Rapportées au 1 cm³, les titres des dilutions sont donc : 10⁻⁶ : au moins 33 D. M. M. ; 10⁻⁴ : au moins 3 300 ; 10⁻² : au moins 330 000.

Nous avons vu que cette dilution 10⁻² est précisément la dilution mère. Elle est préparée en émulsionnant 200 doses vaccinales dans 8 cm³.

Une dose vaccinale correspond à $\frac{8}{200}$ cm³ de cette dilution, donc, la dose vaccinale d'un vaccin, tuant 6/6 à 10⁻⁶, contient

au moins 13 200 D. M. M. Une mesure plus exacte en D. M. 50 p. 100, selon la méthode de Reed et Muench, a été appliquée à plusieurs reprises, et depuis le début de l'année 1953, elle est utilisée de préférence, dans le but d'harmoniser les techniques dakaroises avec celles pratiquées à l'étranger.

Dans cette méthode, 2 cm³ de suspension vaccinale préparée avec le contenu d'une ampoule de vaccin sec sont considérés comme l'unité. Des dilutions successives au 1 : 10, 1 : 100... jusqu'au 1 : 1 000 000 sont préparées et inoculées par voie intracérébrale, à raison de 0,03 cm³ par animal, à des lots de 6 souris.

Les résultats montrent que le « point terminal 50 p. 100 » se tient habituellement entre le 1 : 20 000 et le 1 : 50 000, ce qui correspond à un titre de 660 000 à 1 650 000 D. M. 50 p. 100 par centimètre cube. Puisque 2 cm³ de vaccin servent à vacciner 100 personnes, la dose individuelle contient de 13 200 à 33 000 D. M. 50 p. 100.

Les deux techniques nous donnent donc des résultats comparables.

La technique utilisée à Dakar jusqu'à la fin de 1952 suffirait à contrôler, par la comparaison rapide des taux de mortalité, les doses vaccinales et les « End points » des différents lots titrés.

Chaque année, une douzaine de lots sont en effet titrés :

1° Après conservation au réfrigérateur ;

2° Après exposition des ampoules à la température du laboratoire (aux environs de 28° C) durant trente et soixante jours.

En outre, certains lots sont titrés après exposition pendant une durée plus ou moins prolongée à une température plus élevée (étuve à 37° C).

Les titrages effectués du 1^{er} janvier 1952 au 6 octobre 1952 et portant sur 30 échantillons montrèrent que le vaccin conservé au réfrigérateur contenait toujours plus de 13 200 D. M. M. par dose vaccinale.

Par contre, exposée à une température plus élevée, la dose vaccinale a été deux fois inférieure à 4 170 D. M. 50 p. 100 correspondant au « End point » $10^{-5,5}$: un vaccin conservé cinq mois au réfrigérateur et exposé quinze jours à la température de l'étuve (37° C), et un vaccin (B 31) conservé trente jours à la température du laboratoire ; encore, pour ce dernier, s'agit-il d'un accident technique lors du titrage, car un nouveau titrage, trente jours plus tard, s'est montré satisfaisant : 6/6 à 10^{-3} et 10^{-4} , 5/6 à 10^{-5} et 2/6 à 10^{-6} .

Il résulte néanmoins de ces contrôles qu'après avoir été exposé à 28° C durant un mois, une certaine baisse d'activité peut se manifester, baisse qui s'accroît au cours du deuxième mois.

Nous admettons que le vaccin à utiliser par scarification doit

titrer au moins 250 000 D. M. 50 p. 100 par centimètre cube et que la dose individuelle doit être au minimum de 5 000 D. M. 50 p. 100 (soit dix fois supérieure au minimum exigé par l'Organisation Mondiale de la Santé pour le vaccin 17 D *injectable*).

Aussi, insistons-nous sur le fait que les qualités du vaccin ne sont pas inaltérables et que pour garder ses propriétés immunisantes, il y a lieu d'observer les règles de transport et de conservation précédemment indiquées.

V. — TEST DE NEUTRALISATION.

Il est employé à Dakar, non seulement pour le contrôle de l'immunité conférée par la vaccination, mais aussi pour des enquêtes épidémiologiques.

Il utilise le virus neurotrope sous la forme d'un lot de 40 cerveaux inoculés au 261^e passage (B-55 du 19 mai 1952) et récoltés comme le vaccin, mais sans addition de célite. La pulpe desséchée est répartie en ampoules spéciales contenant chacune la valeur d'un cerveau. Un antisérum d'ânesse sert de témoin positif.

Technique. — On opère en pièce stérile en pilant le contenu d'une ampoule correspondant à 0,4 g de cerveau frais avec 2 cm³ d'eau physiologique. Cela réalise une émulsion au 1 : 50 qui est centrifugée dix minutes au troisième plot de la centrifugeuse de Jouan (environ 3 000 t/m).

0,5 de liquide surnageant sont reportés en 4,5 cm³ d'eau sérumisée 1 : 10 pour obtenir la dilution au 1 : 500.

On prépare ensuite 5 cm³ des dilutions 1 : 5 000, 1 : 50 000, 1 : 500 000 et enfin 2 cm³ de la dilution p. e. 1 : 1 000 000. La distribution débute par le virus sous le volume de 0,50 des dilutions 50 000, 5 000 et 500, à raison d'un tube par dilution et par sérum, plus un témoin positif et un témoin négatif.

Deux tubes sont en outre utilisés pour distribuer 0,50 des dilutions 500 000 et 1 000 000 qui servent à un titrage de contrôle.

Les sérums à tester sont distribués à raison de 0,50 pour chacun des 3 tubes correspondants. De même, les témoins : positif (sérum d'ânesse hyperimmunisée), négatif et contrôle de titrage (sérum de cheval normal 1 : 10).

De ce fait, les dilutions de virus sont devenues respectivement 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ dans les tubes-réaction, et 10⁻⁶, 2 × 10⁻⁶ dans les deux tubes-titrage.

Les tubes sont alors bouchés au caoutchouc et agités séparément en les heurtant sur le portoir. Le tout est emporté dans la pièce à inoculation pour faire 3 souris par tube. Les 9 souris répondant à chaque sérum, marquées différemment selon le titre de la dilution, sont réunies dans un même bocal, de même les 6 souris du titrage.

La durée de l'opération, qui porte parfois sur 40 sérums, doit demeurer inférieure à une heure.

Les souris sont observées quinze jours.

Interprétation. — Les doses de virus inoculées sont respectivement au moins 10, 100 et 1 000 doses sûrement mortelles pour les réactions et 0,5 et 1 pour les titrages qui, ajoutés au témoin négatif, font une gamme étendue sur 5 dilutions.

Les résultats se lisent après quinze jours d'observation. Schématiquement sont classés négatifs les sérums qui n'ont protégé aucune souris, positifs (+) les sérums qui ont protégé les souris inoculées avec la dilution 10^{-5} , positifs (++) les sérums protégeant les souris inoculées avec la dilution 10^{-4} , et enfin positifs (+++) les sérums protégeant toutes les souris y compris celles inoculées avec la dilution 10^{-3} .

Dans les cas limite ou paradoxaux, il est nécessaire d'interpréter en tenant compte au besoin de la durée de la survie, ou bien on recommence l'épreuve.

VI. — ACTIVITÉ EN 1951.

1° Vaccin : 100 lots préparés, 88 160 ampoules produites pour près de 9 000 000 de vaccinations.

2° Titrages : 36 lots de vaccin, plus 1 lot ayant séjourné cinq mois en glacière et quinze jours à la température ordinaire.

3° Tests de neutralisation : 633 dont 628 concluants.

Dans sa sécheresse, ce bilan montre l'extension atteinte par la vaccination de Dakar en Afrique noire française où la fièvre jaune est devenue plus rare que la variole et où sa forme épidémique a pratiquement disparu.

Cette victoire n'est pourtant pas définitive [47]. L'agent pathogène se maintient dans un cycle extra-humain. Tant que le réservoir à virus n'aura pas été stérilisé, la vaccination demeurera l'unique moyen pratique de prévenir ces flambées épidémiques rurales dont le Nouveau Continent offre des exemples actuels.

C'est à fournir l'arme de cette prévention que l'Institut Pasteur de Dakar consacre une part importante de son œuvre.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] MATHIS, SELLARDS et LAIGRET. *C. R. Acad. Sci.*, 1928, **186**, 604.
- [2] SELLARDS et HINDLE. *Brit. med. J.*, 1928, 713.
- [3] PETTIT. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 256, 258, 260.
- [4] THEILER. *Am. J. trop. Med.*, 1930, **24**, 249.
- [5] FINDLAY et CLARKE. *Trans. Roy. Soc. trop. Med.*, 1934, **28**, 193.
- [6] FINDLAY et CLARKE. *Trans. Roy. Soc. trop. Med.*, 1935, **28**, 579.
- [7] STEFANOPOULOU. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1932, **25**, 866.

- [8] SAWYER, KITCHEN et LLOYD. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1931, 29, 62.
- [9] SELLARDS et LAIGRET. *C. R. Acad. Sci.*, 1932, 494, 1609.
- [10] ARAGAO. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 412, 1471.
- [11] PETTIT et STEFANOPOULO. *Bull. Off. Int. Hyg. publ.*, 1934, 26, 1073.
- [12] LAIGRET. *Bull. Off. Int. Hyg. publ.*, 1934, 26, 1078.
- [13] SELLARDS et LAIGRET. *C. R. Acad. Sci.*, 1936, 202, 1467.
- [14] MATHIS et DURIEUX. *Bull. Acad. Méd.*, 1936, 416, 226.
- [15] PELTIER, DURIEUX, JONGHÈRES et ARQUIÉ. *Bull. Acad. Méd.*, 1939, 421, 657 ; *Bull. Acad. Méd.*, 1940, 423, 137, et *Rapports sur le fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de l'Afrique Occidentale Française de 1939 à 1951*.
- [16] PELTIER. *Congrès international Méd. trop. Hyg.*, 1948, 4, 489.
- [17] SOPER. *Amer. J. trop. Med.*, 1952, 4, n° 3.

LA RÉACTION DE DUBOS ET MIDDLEBROOK, TEST CYTO-CHIMIQUE DE LA VIRULENCE DES MYCOBACTÉRIES

par J. VIALLIER et J. TIGAUD (*).

(*Institut Bactériologique de Lyon.*)

La recherche de la virulence prend un intérêt singulier pour la classification et l'identification des Mycobactéries dont les souches si diverses se distinguent souvent par ce seul caractère.

En 1948, R. Dubos et G. Middlebrook décrivent une méthode nouvelle [1] : la coloration par le rouge neutre, dans certaines conditions très strictes de pH (8,9). Ce test cyto-chimique de la virulence est de réalisation rapide et s'oppose, de façon absolue, à la méthode classique d'inoculation à l'animal. Dans les conditions requises, les Mycobactéries virulentes se colorent en rouge, les Mycobactéries non pathogènes en jaune. P. Hauduroy et Posternak-Gallia [2] introduisirent la méthode en Europe. Lea Richmond et Cummings [3], Asselineau et Lederer [4], F. Ingrao et C. Vetere [5] ont consacré de longs mémoires à cette méthode de détermination de la virulence, en étudiant la spécificité et le mécanisme pathogénique. Actuellement, tout une série de substances sont utilisées, concurremment au rouge neutre : test au bleu de Nil de Paraf, Desbordes et Fournier [6], réaction de F. J. Wilson, Catherine Kalish et Charles H. Fish [7]. P. Hauduroy et R. M. Loretan [8], dans un article récent, comparent les résultats fournis par ces différents tests. La sensibilité originale de la Mycobactérie au PAS ou à l'isoniazide, la croissance dans un milieu contenant de l'antitoxine diphtérique ont été proposées comme tests de virulence.

Nous avons par ailleurs étudié [9] la technique de la réaction de Dubos. Rappelons qu'il ne s'agit nullement d'une coloration bactérienne susceptible de permettre l'identification des germes, qu'elle ne peut se pratiquer que sur des cultures. Tous les essais que nous avons effectués pour appliquer ce test cyto-chimique à l'étude des bacilles contenus dans des produits pathologiques sont restés infructueux. Frappés, comme P. Hauduroy, par la

(*) Manuscrit reçu le 8 juillet 1953.

différence d'affinité tinctoriale des diverses souches de *Mycobactéries* virulentes pour le rouge neutre, nous avons pensé qu'une étude spectroscopique [10] nous permettrait de classer d'une façon plus rationnelle les souches examinées. Avec la technique que nous avons proposée, nous avons cherché si le rouge du rouge neutre correspondait à une bande d'absorption définie dans le vert. L'étalement de la bande caractéristique de la réaction positive nous aurait permis de nuancer les réponses, en les chiffrant. En réalité, il n'est pas possible d'isoler une bande spectrale définie. Pourtant, si l'on envisage simplement la limite de l'absorption du côté du rouge, on peut classer les germes d'après une seule longueur d'onde et obtenir ainsi un chiffre plus objectif qu'une simple appréciation de coloration. Cette méthode nous a paru utile pour certaines recherches expérimentales que nous avons poursuivies.

Nous avons utilisé aussi une deuxième variante de la méthode, qui dispense du lavage préalable des bacilles par le méthanol à 50 p. 100 et permet de suivre pas à pas la coloration des éléments de la colonie. La goutte de suspension aqueuse de la colonie de *Mycobactéries* est placée entre lame et lamelle sur la platine d'un microscope à contraste de phase. On repère une colonie dans le champ microscopique. On fait ensuite tomber une solution de rouge neutre, mélangée en proportion convenable à la solution tampon, au voisinage immédiat d'un bord de la lamelle de façon que la goutte, en s'étalant, vienne mouiller ce bord. Le liquide est aspiré sous la lamelle en disposant, du côté opposé, un petit rectangle de papier filtre qui absorbe le liquide en excédent. On règle facilement le débit de colorant. En examinant la préparation, on voit un courant liquidien la parcourir entraînant des débris, des bacilles isolés, et les différents éléments de la colonie se colorent sous l'œil de l'observateur. L'absence de lavage préalable par le méthanol à 50 p. 100 ne nous a jamais gênés dans nos observations.

La réaction de Dubos et Middlebrook permet de distinguer, rappelons-le, les *Mycobactéries* virulentes qui se colorent en rouge, et les *Mycobactéries* non virulentes qui se colorent en jaune. R. Dubos et G. Middlebrook ont étudié 22 souches de *Mycobactéries*, Hauduroy et Y. Posternak-Gallia 58 bacilles tuberculeux, 67 *Mycobactéries* non pathogènes, 26 souches de microbes non acido-alcool-résistants, F. Ingrao et C. Vetere, 42 bacilles tuberculeux et 218 *Mycobactéries* classées non pathogènes. Nous-mêmes avons, à l'heure actuelle, testé 311 bacilles tuberculeux, dont 304 bacilles humains récemment isolés de lésions tuberculeuses diverses, 3 souches humaines de collection, 4 souches bovines, puis 6 souches pisciaires, 5 *Mycobactéries* non pathogènes, 25 germes non acido-alcool-résistants. Des cas particuliers méritant discussion se sont présentés. Hauduroy, dans diverses publi-

cations, a signalé la teinte particulière prise par le BCG, un rouge un peu violacé, carminé. Nous avons retrouvé ce fait qui, à première vue, peut paraître surprenant car il nous fait ranger le BCG parmi les germes pathogènes si l'on interprète la réaction d'une façon stricte. Hauduroy [41] a signalé que le BCG est pathogène pour *Mesocricetus auratus* sans que du reste, par ce passage, il soit possible de lui faire récupérer une virulence quelconque pour d'autres espèces. Hauduroy signale que 4 souches de bacilles acido-alcoolo-résistants, isolées à partir de larves de *Pulex irritans* nourries avec une émulsion de lépromes, se colorent en rouge. De même, le bacille de Stefansky que nous avons pu étudier donnait une réaction positive.

L'habitude est de définir la virulence des Mycobactéries par rapport à leur aptitude pathogène pour le cobaye ou pour l'homme. Le test cyto-chimique de Dubos et Middlebrook révèle probablement une aptitude pathogène latente, sans préjuger de l'espèce animale à laquelle elle s'applique. L. Richmond et M. M. Cummings ont isolé du radis une Mycobactérie non pathogène qui se colorait en rouge par le rouge neutre, et J. Desbordes et E. Fournier [42] ont observé pour une Mycobactérie F 3 réputée non pathogène une coloration en rouge. Ces rares exceptions n'enlèvent pas sa valeur à la réaction, le doute persiste sur l'aptitude pathogène éventuelle de ces souches.

A l'opposé, F. Ingrao et C. Vetere indiquent que 5 souches à test cyto-chimique négatif ont tuberculisé le cobaye. Ces Mycobactéries avaient été isolées de mouches. Les auteurs ne précisent pas si la souche a été cultivée après passage à travers l'organisme du cobaye et ce qu'a donné alors la coloration par le rouge neutre. Les mouches sont l'hôte fréquent de Mycobactéries non pathogènes, mais elles peuvent transporter aussi d'authentiques bacilles tuberculeux. Or, nous avons pu isoler d'organismes humains longuement traités par des antibiotiques des germes [48] à virulence cyto-chimique très atténuée. D'autre part, une de nos souches [49] isolée de l'expectoration d'une malade atteinte de tuberculose pulmonaire a vu par culture sur milieu pauvre la réaction de Dubos s'atténuer et disparaître. L'inoculation à l'animal donna naissance à une tuberculose expérimentale à marche lente mais incontestable. La culture sur milieu de Löwenstein du caséum ganglionnaire donna naissance à des colonies de bacilles se colorant en rouge par le rouge neutre. Nous poursuivons d'autres recherches sur ce point particulier.

La réaction de Dubos est sujette à des variations ou, si l'on veut, l'affinité des bacilles pour le rouge neutre est sujette à d'importantes modifications. Dubos et Sutter [43] ont constaté que certains éléments étaient capables d'empêcher la fixation du rouge neutre sur les corps bactériens. Ils signalent, par exemple, que la réaction est négative pour les germes cultivés en présence

de concentrations élevées d'asparagine. Le lavage par le méthanol à 50 p. 100 est destiné à supprimer cette action inhibitrice.

Plus importantes sont les variations suivant l'âge des bacilles, les bacilles jeunes ne présentent pas le test cyto-chimique de la virulence. Lorsqu'on examine, avec le microscope à contraste de phase, une colonie de bacilles tuberculeux et lorsqu'on assiste à la coloration par le mélange de rouge neutre et de substance tampon, on constate que les premiers éléments colorés sont des éléments centraux, la colonie se fonce. Sur les colonies minces et allongées, les extrémités ne sont pas colorées, pas plus, du reste, que les prolongements des grosses colonies manifestement formées d'éléments bacillaires jeunes. Les bacilles distaux des colonies les plus récemment formées ne donnent pas la réaction de Dubos. Ceci implique la nécessité, croyons-nous, pour apprécier la réaction, de tenir compte des bacilles les plus colorés et d'exiger une croissance suffisante.

Pour étudier de plus près cette influence de l'âge des bacilles « virulents » sur la colorabilité par le rouge neutre, nous avons compté à intervalles réguliers le pourcentage des bacilles colorables des colonies, par rapport aux bacilles totaux. La croissance totale était appréciée elle-même à l'électrophotomètre. Nous avons procédé expérimentalement de la façon suivante : la souche de *Mycobactérie* virulente est ensemencée en fiole de Vivian contenant 50 cm³ de milieu de Youmans, sérum de cheval. Les fioles, placées dans une étuve à 37°, sont agitées journellement pour éviter la formation d'amas microbiens trop importants. A intervalle de temps régulier, on prélève 2 cm³ de la culture, et on apprécie la croissance à l'électrophotomètre puis, ces mesures terminées, on centrifuge les 2 cm³ prélevés, et le culot de centrifugation ayant été coloré par le procédé de Dubos et Middlebrook, on compte les bacilles colorés et non colorés sur plusieurs colonies. Nos mesures n'ont pas été poursuivies au delà du cinquième jour.

Nous avons ainsi établi les courbes de croissance totale et celles des bacilles colorables pour 18 souches de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*. M. W. Fisher et Waldemar F. Kirchenner [14], étudiant la croissance de 15 souches de *Mycobactéries*, ont constaté qu'une phase arithmétique linéaire relativement longue succédait directement à la phase logarithmique. Les courbes de croissance totale que nous avons obtenues sont tout à fait superposables, avec une phase de latence plus ou moins longue, une phase de croissance pseudo-logarithmique et, enfin, une phase de ralentissement et d'arrêt de la pousse. La courbe de bacilles colorés par le rouge neutre varie selon la provenance des bacilles ensemencés et peut se résumer à 3 types principaux. Dans un premier type, la courbe montre un accrois-

sement numérique régulier des bacilles colorés à partir du pourcentage initial des bacilles ensemencés, mais la phase de latence est plus longue, la phase de croissance exponentielle retardée par rapport à la même phase de croissance globale. Tout se passe comme si, au début, la multiplication bacillaire donnait naissance à des bacilles ne prenant pas le rouge neutre, l'apparition de cette aptitude tinctoriale ne survenant qu'ultérieurement. Dans la phase de ralentissement de la pousse, au contraire, les bacilles déjà formés complètent leur maturation et courbe de rouge neutre et courbe de croissance tendent à se rejoindre.

Le deuxième groupe concerne 4 souches dont la pousse, après un certain temps de latence, s'est montrée extrêmement rapide. La courbe de rouge neutre montre une inflexion vers le bas, le nombre de bacilles colorables devenant inférieur à ce qu'il était au début de l'expérience.

Le troisième type (4 souches) se rencontre lorsque l'ensemencement est effectué à l'aide de bacilles jeunes, adaptés à pousser dans le même milieu avec des repiquages fréquents. Dans ce cas, la phase de latence de la courbe de croissance n'est pas visible. On ne retrouve que la phase exponentielle et la phase de ralentissement. On retrouve une courbe de rouge neutre sensiblement comparable à celle du premier type. Des intermédiaires sont possibles entre ces trois types de courbe que nous avons choisis comme point de repère. L'établissement de courbes de ce type nous semble avoir un certain intérêt pour fixer non seulement la multiplication des germes mais, encore, leur temps de maturation.

Curieux furent les résultats que nous avons obtenus en cultivant des bacilles virulents sur des milieux pauvres. Cinq souches virulentes, repiquées de milieux de Youmans en eau peptonée glycinée à 5 p. 100 ont perdu leur colorabilité par repiquages successifs. Prenant un milieu de culture plus pauvre encore, l'eau ordinaire stérilisée, nous avons constaté pour 12 souches que l'affinité tinctoriale pour le rouge neutre diminue encore plus vite.

La streptomycine, le PAS, l'isoniazide, mis au contact de bacilles virulents, à des taux nettement supérieurs à l'unité bactériostatique, pendant des délais variables jusqu'à quinze jours, n'ont en rien modifié la réaction de Dubos.

Les bacilles morts comme les bacilles vivants se colorent en rouge par la technique classique. Nous avons étudié le phénomène à l'aide de la méthode spectroscopique, sur 3 souches de *Mycobactéries* pathogènes et 3 souches non pathogènes. La mort des bacilles issus d'une culture de plus de quarante-cinq jours a été obtenue pour chacune des souches étudiées par séjour d'une heure à l'autoclave à 120°, par le rayonnement ultra-violet, par cinq jours de contact à 18° avec de l'éther, du formol à 40 p. 100,

de l'alcool à 95°. Pour chaque essai, des mesures comparatives ont été effectuées avec des bacilles témoins vivants provenant de la même culture, sous une épaisseur de 0,3 mm. Les différences entre les chiffres trouvés pour bacilles vivants et bacilles morts en $m\mu$ sont résumées dans le tableau I.

TABLEAU I.

MORT OBTENUE par	SOUCHES DE MYCOBACTÉRIES UTILISÉES						
	Av. L.P.	Av. Fiolo	Av. H37Ra	V. H37Rv.	V. H. Gai..	V. H. Per..	V. Aviaire
Autoclave une heure à 120°	0	0	0	+ 5	+ 5	+ 20	+ 5
Rayons ultra-violet	0	0	0	0	0	0	0
Ether.	0	0	0	0	0	0	0
Formol.	+ 5	+ 5	+ 5	+ 5	+ 10	+ 10	+ 5
Alcool à 95°.	0	0	0	0	+ 5	0	0

Tableau indiquant les différences trouvées par examens spectroscopique entre le chiffre donné sur l'échelle par la limite d'absorption du côté du rouge des bacilles vivants après coloration par le rouge neutre et le chiffre obtenu après examen des bacilles tués. (Les chiffres sont exprimés $m\mu$: 0, veut dire qu'il n'y a pas eu de discordance entre les deux chiffres ; + 10 veut dire que le début de l'absorption du côté du rouge pour les bacilles tués correspondait sur l'échelle à un chiffre supérieur de 10 $m\mu$).

L'étude de ce tableau montre de très faibles variations de l'affinité tinctoriale pour le rouge neutre des différents bacilles étudiés. On peut se demander si les variations minimales observées pour les bacilles virulents étaient réellement dues à une fixation plus grande de colorant pour chaque bacille ou, simplement, à la contraction sous un plus faible volume de la substance colorée. Ces divergences ont été notées lorsque les bacilles étaient tués par une substance chimique. Les bacilles avirulents ont présenté des variations équivalentes.

On peut penser que des souches de Mycobactéries pathogènes régulièrement entretenues au laboratoire par repiquages successifs sur le même milieu conservent un pouvoir pathogène relativement stable et doivent, de ce fait, avoir une affinité tinctoriale pour le rouge neutre constante. Nous avons répété l'examen spectroscopique de certaines souches, colorées à intervalles plus ou moins lointains, atteignant plus d'un an. L'écart maximum observé entre deux mesures successives n'a pas dépassé 10 $m\mu$, comme le montre le tableau II. Nous croyons donc que l'affinité tinctoriale d'une souche donnée pour le rouge neutre reste un caractère remarquablement fixe.

Le dernier problème que nous avons voulu étudier est celui

TABLEAU II.

SOUCHE	NOMBRE des mesures	INTERVALLE compris entre la première et la dernière mesure en mois	ÉCART EXTRÊME des mesures faites sous 0,3 mm épaisseur en m μ
H37Rv (m. de Youmans) .	17	20	5
H37Rv (Löwenstein)	7	21	5
H37Ra	5	22	5
M. phlei	7	18	10
L. P.	9	17	10
BCG	5	22	5
Gaid.	12	20	5
Per.	10	20	5
Thom.	10	20	10

des rapports qui régissent la coloration de *Mycobacterium tuberculosis* par le rouge neutre et la virulence du bacille pour le cobaye. Les différences d'affinité tinctoriale pour le rouge neutre dans les conditions de la réaction de Dubos, observées entre des souches de bacilles tuberculeux, sont-elles significatives et correspondent-elles à des différences du pouvoir pathogène pour le cobaye ? Nous avons, par ailleurs, rapporté nos conditions expérimentales [19]. Les bacilles cultivés sur milieu de Löwenstein ont été pesés entre le vingt-cinquième et le trentième jour de leur croissance, broyés et émulsionnés dans de l'eau physiologique. Pour chaque souche, 3 animaux ont été inoculés de façon semblable. La coloration de Dubos a été effectuée sur le liquide de dilution restant, selon la méthode classique. Pour apprécier la virulence cobaye nous avons tenu compte de la survie des animaux inoculés, mais nous avons éliminé ceux pour lesquels l'autopsie ne révélait pas une généralisation de l'infection et des lésions hépatiques, spléniques et pulmonaires suffisantes. Nous n'avons pas constaté de relation directe ni un parallélisme absolu entre la virulence pour le cobaye et l'intensité de la coloration par le rouge neutre, néanmoins, les souches fortement colorées furent douées pour le cobaye d'une virulence importante ou moyenne. Aucune souche fortement colorée ne se montra peu virulente pour le cobaye. Il n'est pas possible de conclure de façon absolue. Il nous paraît simplement que le rouge neutre nous renseigne sur un facteur de la virulence sans préjuger de l'existence d'autres facteurs que nous ignorons.

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer le mécanisme de la réaction de Dubos. Asselineau et Lederer [4], les premiers, trouvent que l'acide mycolique libre des cires et un liposaccharide azoté et phosphoré, à haut point de fusion, extrait

des lipoides des bacilles tuberculeux, se colorent en rouge par le rouge neutre.

A l'opposé, Desbordes et Fournier [15] laissent entendre que le rouge neutre étant un colorant vital et un indicateur « Redox » la coloration pourrait dépendre d'un potentiel d'oxydo-réduction intracellulaire différent selon les souches utilisées et dépendant de l'« équipement enzymatique initial ». Si l'on admet ce dernier mécanisme, on ne voit pas comment des bacilles tués conservent un potentiel d'oxydo-réduction intracellulaire jusqu'à trente jours après leur mort, comme nous avons pu le vérifier. Même en admettant que les bacilles restent remarquablement protégés, de toute nécessité des échanges doivent rester possibles avec le milieu extérieur. Bloch [16] a mis au point un procédé dans lequel la rapidité de décoloration du bleu de méthylène par les Mycobactéries est inversement proportionnelle à leur virulence. Cette réduction du bleu de méthylène en son leucodérivé est entièrement différente de ce qui se passe dans la réaction de Dubos. Elle doit être recherchée en l'absence d'oxygène moléculaire, sous vide ou en tube de Thunberg; le virage est constaté sur le liquide surnageant, alors que dans la réaction de Dubos qui se pratique à l'air libre, ce sont les bacilles eux-mêmes qui se colorent et non le liquide surnageant. Nous avons, utilisant 5 souches virulentes et 5 souches avirulentes, en fin de croissance, recherché le potentiel limite d'oxydo-réduction en tube de Thunberg, à l'étuve à 37°. Nous nous sommes adressés à 4 colorants : le bleu de méthylène (rH 14), le bleu de Nil (rH 10,9), le vert janus (vert Visba B — rH 6) et le rouge neutre (rH 3) et n'avons pas prolongé l'observation plus de trois jours pour éviter que la cytolysse ne vienne modifier les résultats, en diminuant le potentiel d'oxydo-réduction et la vitesse de décoloration des indicateurs. Ces expériences, résumées dans le tableau III, et dans les détails desquelles nous ne pouvons pas entrer ici, nous ont inspiré plusieurs remarques. Il est bien exact que les bacilles avirulents ont une respiration plus active que les bacilles virulents, mais il ne semble pas que leur système respiratoire soit fondamentalement différent de celui des bacilles virulents puisque leur potentiel limite d'oxydo-réduction est, pour les deux types de bacilles, supérieur au potentiel de virage du rouge neutre. Si les Mycobactéries pathogènes et non pathogènes diffèrent par des phénomènes de réduction mis en évidence par le rouge neutre, on peut expliquer que les germes non virulents, dont l'activité respiratoire est élevée, réduisent le rouge neutre ou, du moins, le laissent à l'état réduit, mais on ne peut pas admettre que les bacilles virulents transforment le rouge neutre et le fassent passer de l'état réduit à l'état oxydé. Comment expliquer aussi que les bacilles jeunes en voie de croissance qui présentent une activité respiratoire plus élevée,

TABLEAU III. — Colorants.

pH	SOUCHES	BLEU DE MÉTHYLENE	BLEU DE NIL	VERT VISBA B	ROUGE NEUTRE
pH 8,9	Avirulentes.	Bleu, décol. 18 h.	Bleu, décol. 18 h.	Bleu 36 h., rose moins de 48 h., décol. 72 h.	Jaune après 72 h., ba- cilles non colorés.
	Virulentes.	Bleu, décol. 24 h.	Bleu, décol. 24 h.	Bleu 36 h., encore rose après 48 h., décol. 24 h. environ.	Jaune après 72 h., ba- cilles rouges avant 48 h., jaunes après 72 h., virage dans l'intervalle.
pH 6,8	Avirulentes.	Bleu, décol. 18 h.	Bleu, décol. 18 h.	Bleu 24 h., rose moins de 36 h., décol. moins de 48 h.	Liquide rouge avant 48 h., jaune après 48 h., bacilles non colorés.
	Virulentes.	Bleu, décol. 18 à 24 h.	Bleu, décol. 18 à 24 h.	Bleu plus de 36 h., rose après 48 h., décol. 72 h. environ.	Liquide rouge avant 48 h., jaune après 72 h., bacilles rouges avant 48 h., jaunes après 72 h.

laissent le rouge neutre à l'état réduit, alors que ces mêmes bacilles, parvenus à l'état de bacilles mûrs, l'oxyderont.

A cette théorie de l'oxydo-réduction s'oppose la théorie chimique. Rien n'empêche, si l'on admet ce mécanisme, que des bacilles morts conservent sous la forme de l'acide mycolique et du polysaccharide cité plus haut le souvenir de leur virulence passée. La variabilité de l'affinité tinctoriale selon l'âge s'accorde parfaitement de cette théorie, et Asselineau [17] a bien montré que la teneur en lipides libres totaux des bacilles jeunes n'est que de 7 à 10 p. 100 du poids sec des bacilles, au lieu de 20 à 22 p. 100 chez les bacilles âgés.

Il est classique, comme l'a récemment souligné L. Nègre [20], que la virulence des bacilles jeunes est moins élevée que celle des bacilles âgés.

Nous sommes persuadés que la réaction de Dubos est due à des substances définies présentes dans le corps bacillaire, agissant par des groupements acides. Peut-être ne sont-elles pas, du reste, le seul facteur de la virulence, puisque des bacilles morts gardent leur affinité tinctoriale.

En conclusion, la spécificité de la réaction de Dubos et Middlebrook nous a paru suffisante sous certaines conditions que nous nous sommes efforcés de préciser.

La confrontation avec la virulence sur le cobaye comporte des exceptions, mais a une concordance en général telle que l'on

peut admettre la réaction de Dubos comme un test de virulence. La réaction varie en fonction du milieu de culture et de l'âge des bacilles. Son mécanisme, encore discutable, peut être attribué à la présence de certains groupements acides des cires, sans préjuger de l'intervention possible d'autres facteurs.

RÉSUMÉ.

La coloration par le rouge neutre, dans certaines conditions précisées par R. Dubos et G. Middlebrook, permet de classer les Mycobactéries en virulentes et non virulentes. Le test cytochimique s'oppose de façon absolue à la méthode classique d'inoculation à l'animal. La méthode spectroscopique et la coloration dans le champ microscopique peuvent être utilisées. Il existe de rares divergences entre les résultats du test cytochimique et le pouvoir pathogène du même germe tel que nous le concevons. L'affinité tinctoriale des Mycobactéries virulentes pour le rouge neutre varie selon les souches sans qu'on puisse chiffrer exactement la virulence par l'intensité de la coloration. Il n'y a ni parallélisme absolu, ni concordance stricte, mais une relation certaine entre les résultats fournis par le test cytochimique et l'inoculation au cobaye des souches virulentes. La teinte prise sous l'influence du rouge neutre par les Mycobactéries virulentes est assez caractéristique de la souche considérée. Les bacilles virulents jeunes se colorent comme les bacilles avirulents ; ils acquièrent la colorabilité par le rouge plus ou moins rapidement selon les conditions de développement et le milieu utilisé. Les bacilles virulents tués par des procédés physiques ou chimiques conservent leur affinité tinctoriale pour le rouge neutre. Deux hypothèses expliquent le mécanisme de la réaction de Dubos. Les expériences réalisées sont en faveur de la fixation ou du phénomène d'oxydo-réduction se produisant au niveau d'une substance chimique particulière contenue en quantité variable, ou absente, selon que la Mycobactérie est ou non virulente.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. DUBOS et G. MIDDLEBROOK. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1948, **58**, 698.
- [2] P. HAUDUROY et Y. POSTERNAK-GALLIA. *Ces Annales*, 1949, **77**, 91.
- [3] L. RICHMONT et M. M. CUMMINGS. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1950, **62**, 632.
- [4] J. ASSELINEAU et E. LEDERER. *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 781.
- [5] F. INGRAO et C. VETERE. *Ann. Ist. Carlo Forlanini*, 1952, **43**, 333.
- [6] J. PARAF, J. DESBORDES, E. FOURNIER et GUYOT-JEANNIN. *Ann. Biol. Clin.*, 1952, **40**, 557.
- [7] F. J. WILSON, C. KALISH et L. H. FISH. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1952, **65**, 187.
- [8] P. HAUDUROY et R. M. LORETAN. *Rev. Pathol. gén.*, 1953, n° 645, 169.

- [9] J. VIALIER, J. C. KALB et J. TIGAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 1513.
- [10] J. VIALIER et J. TIGAUD. *Ces Annales*, 1952, **83**, 402.
- [11] P. HAUDUROY. *Rev. Belge Pathol. Méd. exp.*, 1951, **21**, 11.
- [12] J. DESBORDES, E. FOURNIER et GUYOT-JEANNIN. *Ann. Biol. Clin.*, 1951, **9**, 151.
- [13] R. DUBOS et SUTTER. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1949, **60**, 384.
- [14] M. W. FISHER, W. F. KIRCHENNER et A. R. HESS. *J. Bact.*, 1951, **62**, 319.
- [15] J. DESBORDES et E. FOURNIER. *Ces Annales*, 1950, **79**, 211.
- [16] H. BLOCH. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1950, **61**, 270.
- [17] J. ASSELINEAU. *Ces Annales*, 1951, **81**, 306.
- [18] J. VIALIER et J. TIGAUD. *J. Médecine Lyon*, 1950, n° 743, 1075.
- [19] J. VIALIER et J. TIGAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 281.
- [20] A. NÈGRE. *Les lipoides dans les bacilles tuberculeux et la tuberculose*. Masson édit., Paris, 1950.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACTION DES ALCALOÏDES SUR LES BACTÉRIES

par SUZANNE LAMBIN et JACQUELINE BERNARD (*).

(Laboratoire de Microbiologie
de la Faculté de Pharmacie de Paris.)

L'étude de l'action des alcaloïdes sur les bactéries a été envisagée par différents auteurs. Il semble que Lubbert [26], en 1886, ait l'un des premiers étudié l'action antiseptique de certains d'entre eux sur le Staphylocoque. Brigandat [6], en 1891, exposant ses recherches sur la conservation des solutions d'atropine, conclut que cet alcaloïde ne possède aucune action inhibitrice. W. S. Ssadikow [35] en 1912 note une certaine activité de la strychnine à l'égard de quelques espèces bactériennes et propose une classification des bactéries basée sur leur comportement vis-à-vis de ce corps. La recherche de l'activité antibactérienne de la quinine et de ses dérivés a fait l'objet de nombreux travaux (O. H. Brown [7] en 1912, J. Morgenroth et I. Tugendreich [27] et A. Loeser [25] en 1917, R. Bieling [4] en 1918, W. Kolle et H. Schlossberger [17] en 1923, F. H. Johnson et I. Lewin [14] en 1945). D'autres auteurs se sont intéressés à quelques alcaloïdes particuliers et ont recherché leur activité bactériostatique à l'égard de diverses espèces bactériennes (A. Haim et Torres [13], V. Soituz [33], T. H. Amako [1], A. Lode et A. Howard [24], J. P. Todd et H. L. Smith [36], B. Vainberg et V. Krasnogolovez [38], F. Obaton [28], E. Bonetti et A. Illeeny [5], P. Bernouilli [3], Shu Chung Lu et Lan Tien Ho [32]). Certains ont étudié la sensibilité à quelques alcaloïdes du bacille de Koch (H. J. Corper, H. Gauss et O. B. Reusch [8], L. Karwacki et S. Biernacki [16], A. J. Levy [23], R. Paris et A. German [29]). Dans ces dernières années C. C. Johnson et ses collaborateurs [15] ont entrepris l'étude de nombreux dérivés à l'égard d'*Escherichia coli* et d'*Aerobacter aerogenes*.

Il nous a semblé intéressant de reprendre de façon systématique l'étude de l'influence de substances alcaloïdiques sur diverses espèces bactériennes [2]. Nous avons déterminé leur activité bactériostatique à l'égard de 8 espèces différentes choisies parmi les

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1953.

Eubacteria, sporulées ou non, à réaction de Gram positive ou négative, et sur *Mycobacterium tuberculosis* (souche Brévannes). Nous avons recherché l'activité bactéricide de quelques-uns de ces corps, puis l'existence d'une éventuelle action stimulante à l'égard de la croissance bactérienne.

I. — RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE A L'ÉGARD DE DIVERSES *Eubacteria*.

Les corps à l'étude (1) étaient généralement des sels alcaloïdiques ; mais la colchicine, la nicotine, l'anabesine, la xanthofagarine et la cassaine ont, en raison de leurs caractères particuliers de solubilité, été étudiées à l'état de bases. Les solutions des sels alcaloïdiques étaient préparées extemporanément en eau distillée stérile, la cassaine était solubilisée dans l'alcool dilué.

La méthode utilisée pour déterminer la dose bactériostatique fut la technique classique des dilutions en milieu liquide. Cependant, pour quelques corps insolubles dans les milieux liquides, nous avons dû faire appel à une technique moins précise, qui consistait à cultiver les bactéries à la surface d'un milieu solidifié contenant en suspension les dilutions du corps à l'étude.

Les milieux de culture utilisés furent les suivants :

a) Milieu liquide :

Autolysat de levure	14 g
Glucose	20
Phosphate bipotassique	2
Sulfate de magnésium	0,20
Chlorure d'ammonium	1
Sulfate de fer	0,02
Eau distillée	500 cm ³

La réaction était ajustée à pH 7,2 avec une solution de soude à 10 p. 100, le milieu était stérilisé pendant quarante-cinq minutes à 100-105° C, filtré, puis réparti dans des tubes à essai stériles de 18 mm × 18 cm, à raison de 2,5 cm³ par tube, et enfin stérilisé pendant vingt minutes à cette même température. Nous réalisions ainsi un milieu à double concentration que l'addition des solutions alcaloïdiques, des suspensions bactériennes et d'eau distillée stérile devait amener à concentration normale.

Le choix de ce milieu a reposé sur les résultats d'essais préliminaires, relatifs à l'influence de la constitution du milieu de culture sur la dose bactériostatique obtenue. Après avoir utilisé successivement le bouillon de viande, l'eau peptonée (20 p. 1 000), salée (1 p. 1 000), glucosée (1 p. 1 000), un milieu à l'hydrolysate de

(1) Nous avons également étudié l'activité des alcaloïdes totaux d'*Holarrhena floribunda* (Apocynacée) et celle de dérivés synthétiques, tels que la novocaïne et la stovaïne.

caséine (10 p. 1 000), glucosé (2 p. 1 000) et le milieu à l'autolysat de levure dont nous avons donné la formule ci-dessus, nous avons adopté ce dernier ; il nous a permis d'obtenir, en général, des doses bactériostatiques plus élevées que les autres milieux étudiés et nous avons pensé nous mettre ainsi à l'abri d'une interprétation trop favorable de l'activité des substances étudiées. Nous avons résumé les résultats de ces essais dans le tableau I où sont indiquées les concentrations bactériostatiques obtenues pour deux antiseptiques classiques et pour un alcaloïde dans différents milieux de culture, les autres facteurs de l'expérience étant identiques.

TABLEAU I. — Doses bactériostatiques à l'égard de *Staphylococcus aureus* en divers milieux de culture.

Concentration en germes : 10 000 000/cm³. (Grammes pour 1 000 cm³.)

MILIEUX	A L'AUTOLYSAT de levure	EAU peptonée glucosée	BOUILLON peptoné salé	A L'HYDROLYSAT de caséine
Phénol	2,15	2,15	1,85	1,65
Quinosol	0,0075	0,020	0,0075	0,0015
Chl. d'harminé	0,30	0,15	0,25	0,075

Nous avons eu l'occasion de constater que la *forme des réceptifs* utilisés n'était pas sans influencer les résultats des essais. Les doses bactériostatiques (en grammes pour 1 000 cm³) obtenues à l'égard de *St. aureus* en utilisant, d'une part, des tubes à essai de 18 mm × 18 cm contenant 5 cm³ de milieu et, d'autre part, des fioles d'Erlenmeyer de 100 cm³ contenant 20 cm³ de milieu, toutes les autres conditions étant identiques (milieu à l'hydrolysate de caséine, 500 000 germes par centimètre cube), ont été respectivement les suivantes : pour le phénol, 1,65 et 1,25 ; pour le quinosol, 0,00075 et 0,003 ; pour le chl. d'harminé, 0,035 et 0,075.

b) *Le milieu solide* adopté était le bouillon de viande classique, peptoné à 10 g p. 1 000, additionné de 5 g p. 1 000 de ClNa et gélosé à 20 g p. 1 000. Ce milieu était réparti en tubes à essai de 20 mm × 20 cm, à raison de 18 cm³ par tube.

Les espèces bactériennes mises en expérience furent les huit suivantes, dont les souches provenaient de la collection de l'Institut Pasteur ou de celle du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie : *Staphylococcus aureus* (souche +), *Pseudomonas aeruginosa* (souche 1), *Escherichia coli* (souche Samet), *Bacillus mesentericus vulgaris* (souche 100), *Bacillus proteus* X 19 (souche A), *Eberthella typhosa* (souche 1), *Klebsiella pneumoniae* (souche C+), *Shigella dysenteriae* (souche 35).

Pour l'ensemencement des milieux liquides, les suspensions bactériennes utilisées étaient préparées en eau distillée stérile, à partir de cultures, sur bouillon gélosé, âgées de 24 h. à 37° dans le cas des formes végétatives et de 48 h. à 37° pour les germes sporulés. La concentration en germes de ces suspensions était déterminée par voie opacimétrique, par rapport à une suspension étalon dont la concentration en bactéries avait été préalablement déterminée par numérations microscopiques.

Le nombre de germes ensemencés s'est montré susceptible de faire varier de façon considérable les résultats obtenus avec certains corps, fait sur lequel l'une de nous a récemment insisté [21]. Dans le tableau II, nous donnons à titre d'exemple les résultats respectivement obtenus avec des ensemencements de 10 000 000 de germes et de 500 000 par centimètre cube.

TABIEAU II. — Doses bactériostatiques
à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

Milieu à l'autolysat de levure. (Grammes pour 1 000 cm³.)

	NOMBRE DE GERMES par centimètre cube	
	500 000	10 000 000
Phénol	1,65	2,15
Quinosol	0,0035	0,0075
Chl. d'harmine	0,20	0,30

PROTOCOLE D'UN ESSAI EN MILIEU LIQUIDE. — Des essais préliminaires ayant été effectués pour situer la zone des dilutions utiles, les gammes adoptées étaient préparées comme nous l'indiquons dans le tableau III, en ajoutant aseptiquement au milieu de culture à double concentration la solution alcaloïdique, la suspension bactérienne et l'eau distillée stérile.

La lecture des résultats était effectuée après vingt-quatre heures, puis après quarante-huit heures et soixante-douze heures de culture à +37° C. La notation suivante fut adoptée :

Développement normal, identique au témoin	++
Développement moindre, mais évident	+
Développement douteux	±
Absence de culture	0

PROTOCOLE D'UN ESSAI EN MILIEU SOLIDE. — Au moment de l'essai, le milieu gélosé était liquéfié au bain-marie, puis refroidi à 45° C environ, et une série de dilutions décroissantes de la

TABLEAU III. — Schéma d'un essai.

	VOLUMES en centimètres cubes					
Milieu à conc. double.	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Susp. de <i>St. aureus</i> (à 200 000 000/cm ³).	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Sol. sulfate de berbérine au 1/1 000.	2	1,50	1	0,50	0,25	
Eau dist. stérile	0,25	0,75	1,25	1,75	2	2,25
Dilutions finales (grammes de sel pour 1 000 cm ³)	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	Témoin.
Résultats :						
Après 24 heures.	0	0	+	+	++	++
Après 48 heures.	0	++	++	++		
Après 72 heures.	0	++				

substance à l'étude était préparée en eau distillée stérile ; 2 cm³ de chaque dilution étaient prélevés aseptiquement et ajoutés à chacun des tubes de gélose (de 18 cm³). Le contenu de chacun d'eux, après homogénéisation, était transvasé dans une boîte de Petri préalablement stérilisée, laquelle après refroidissement était placée à l'étuve à +37° C pendant vingt-quatre heures pour assurer une dessiccation suffisante du milieu. La gélose était alors ensemencée à l'aide d'un fil coudé préalablement plongé dans une culture en bouillon âgée de 24 heures, et égoutté. Le fil était simplement posé à la surface de la gélose réalisant un seul trait d'ensemencement ; plusieurs espèces bactériennes différentes pouvaient être ainsi ensemencées dans une même boîte de Petri. Pour chaque essai nous préparions une boîte témoin dont la gélose était exempte d'alcaloïde. La lecture des résultats était effectuée après vingt-quatre heures, puis quarante-huit heures et soixante-douze heures de culture à +37° C.

Les résultats obtenus au cours de ces différents essais sont indiqués dans le tableau IV. *Les doses bactériostatiques* des sels alcaloïdiques étudiés et de deux substances témoins (phénol et quinosol) sont exprimées en grammes pour 1 000 cm³ de milieu de culture. Elles représentent la moyenne entre la dose la plus forte qui ait permis le développement de la bactérie en expérience et la dose la plus faible qui ait inhibé sa multiplication durant trois jours.

Quelques alcaloïdes n'ont pu être essayés à toutes les concentrations désirables, du fait de la difficulté que nous avons eue à nous procurer ces corps rares ou trop onéreux (dextro-tubocurarine, chélidonine, lobéline).

TABLEAU IV. — Doses bactériostatiques des alcaloïdes (grammes pour 1 000 cm³).

Concentration en germes : 10 millions par cm³. Milieu salin à l'autolysat de levure.

	Staphyloc.	B. pyocyan.	E. coli	B. mesent.	B. proteus	E. typh.	Kl. pneum.	Sf. dys.
<u>Substances témoins :</u>								
Phénol: milieu liquide	2,25	1,25	2,25	1,25	2,25	1,75	2,25	1,25
" solide	2,25	1,25	1,25	1,50	1,75	1,75	1,75	1,25
Quinosol: milieu liquide	0,0075	0,50	0,07	0,02	0,20	0,05	0,12	0,02
" solide	0,020	0,45	0,075	0,0075	0,15	0,035	0,035	0,0075
<u>I - Alcaloïdes de constitution non hétérocyclique :</u>								
Kordénine (sulf.)...> 5 ---- Ephadrine (chl.)...>10.								
<u>II - Groupe de la pyridine :</u>								
Cicutine (Br.) et Arécoline (Br.)...>10.... Anabesine...>2.... Lobéline (chl.)...>1....								
Nicotine	8,5	6,50	7,50	11,50	8,50	7,50	8,50	6,50
<u>III - Groupe du tropane</u>								
Atropine (sulf.) et Scopolamine (sulf.)...>10.....								
Hyosciamine (sulf.) ^a	7,50	5,50	6,50	4,50	6,50	6,50	>10	4,50
Cocaïne (chl.)	>10	>10	>10	5,50	>10	8,50	>10	5,50
<u>IV - Groupe du nor-lupinane</u>								
Spartéine (sulf.)	>10	6,50	>10	>10	7,50	>10	>10	2,50
<u>V - Groupe de l'indole</u>								
Esérine (sulf.)...>5.... Brucine (chl.)...>2....								
Yohimbine (chl.)	4,25	>10	2,25	1,25	4,50	2,25	3,50	1,75
Corynanthine (chl.)	2,50	>10	1,75	1,50	3,50	1,25	3,50	1,25
Harmine (chl.) ^a	0,30	0,45	0,30	0,30	0,30	0,15	0,30	0,075
Strychnine (sulf.)	>10	>10	4,50	4,50	5,50	3,50	6,50	3,50
Ibogaïne (chl.)	1,50	1,50	1,50	0,35	1,50	0,75	1,50	0,75
<u>VI - Groupe de la quinoléine</u>								
Quinine (chl.)	2,50	7,50	1,50	0,35	1,50	0,75	1,50	0,75
<u>VII - Groupe de l'isoquinoléine</u>								
Papavérine (chl.) ^f et Narceïne (chl.) ^g ...>1... Mescaline sulf.>5.....								
Narcotine (chl.) ^b	>10	9,50	>10	>10	9,50	9	>10	8,50
Céphéline (chl.)	5,50	>10	5,50	1,50	4,50	2,50	6,50	0,65
Emétine (chl.)	>10	>10	3,50	0,75	>10	2,50	9,50	1,50
Hydrastine (chl.)	7,50	2,50	4,50	4,50	4,50	3,50	6,50	1,50
Berberine (sulf.)	0,35	2,50	1,50	0,35	3,50	3,50	5,50	0,35
Isotétrandrine (acét.) ^a	0,75	0,35	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,15
Gépharanthine (chl.) ^a	1,50	>1	0,35	0,075	1,50	0,75	0,75	0,35
Dextro-tubocurarine	>2	-	-	<2	-	-	-	-

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. — 1° Si nous établissons la valeur comparative approximative des alcaloïdes les plus actifs, d'une part par rapport à un désinfectant, le phénol, d'autre part, par rapport au quinosol, couramment utilisé comme bactériostatique, et enfin par rapport à un alcaloïde, la quinine (en faisant égale à 1 la valeur bactériostatique de chacun de ces corps), nous obtenons la série de coefficients d'activité suivants (tableaux V, VI et VII) :

L'examen de ces coefficients d'activité montre que, parmi les 58 alcaloïdes étudiés, une dizaine se sont montrés, tout au moins à l'égard de certaines espèces bactériennes, plus actifs que le phénol, corps peu bactériostatique.

Les alcaloïdes étudiés ont manifesté une activité bactériostatique inférieure à celle du quinosol. Seuls les chlorhydrates d'apomorphine et d'harmine et l'acétate d'isotétrandrine ont montré une

activité légèrement supérieure vis-à-vis du bacille pyocyanique. Quelques alcaloïdes ont présenté une activité supérieure à celle

TABLEAU IV (suite).

	Staphyloc.	B. pyocyan.	E. coli	B. mesent.	B. proteus	E. typh.	Kl. pneum.	Sh. dys.
VIII - Groupe du phénanthrène								
Morphine (chl.), Codéine (phosph.), Dionine et Héroïne	> 10				> 10			...
Boldine (chl.)	> 10	> 10	1,50	1,50	5,50	2,50	2,50	2,50
Apomorphine (chl.) ^b	0,075	0,35	0,35	0,75	0,15	0,35	0,35	0,035
IX - Groupe de la naphthophénanthridine								
Chélidonine (chl.)	> 1							
Sanguinarine (nitr.) ^c	0,045	> 1	> 1	0,045	> 1	> 1	> 1	0,15
X - Groupe de la glyoxaline								
Pilocarpine (nitr.)	> 10							
XI - Groupe du Tropolone								
Colchicine	> 10							
XII - Groupe de la purine								
Théophylline	> 2							
Caféine ^d	> 10	> 10	7	9	9	4,50	> 10	3,50
Théobromine ^d	8,50	7,50	7,50	> 10	> 10	8,50	> 10	8,50
XIII - Novocaïne et ses sels								
Sébacate - Isobutyrate - Benzoate - Paraoxybenzoate	> 10				> 10			
Phénylbutyrate	> 10	> 10	8,50	5,50	7,50	7,50	> 10	5,50
XIV - Alcaloïdes non sériés								
Aconitine (nitr.)	> 4							
Rotundine (chl.)	> 2							
Xanthofagarine		> 0,20		0,035		> 0,20		
Gassaine	2,50	1,50	> 2	> 2	0,20	1,75	> 2	0,75
Stovaine	8,50	4,50	3,50	5,50	3,50	3,50	5,50	0,90
Conesine (chl.)	> 4	> 4	3,50	3,50	> 4	2,50	4,50	0,75
Veratrine (chl.)	> 10	9	8,50	4,50	> 10	> 10	> 10	4,50
Bromh. des alc. totaux de l'Holarrhène								
	1,50	> 2	1,25	0,75	> 2	> 2	> 2	0,75

(a) - Corps dont les doses bactériostatiques sont exprimées en base et non en sel

(b) - Ces corps étant insolubles dans le milieu de culture, ont été étudiés sous forme de suspension en milieu solide

(c) - Ces corps n'ont pu être étudiés à de plus fortes concentrations en raison de leur faible solubilité dans le milieu de culture

(d) - Ces corps ont été solubilisés en milieu alcalin.

de la quinine, en particulier le nitrate de sanguinarine et le chlorhydrate d'apomorphine qui sont respectivement cinquante-cinq fois et trente-trois fois plus actifs à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

2° Les résultats rassemblés dans le tableau V montrent que les alcaloïdes les plus actifs appartiennent à 5 groupes chimiques différents : ceux de la quinoléine (chl. de quinine), de l'isoquinoléine (chl. de cépharanthine, acétate d'isotétrandrine, sulfate de berbérine), du phénanthrène (chl. d'apomorphine), de la naphthophénanthridine (nitrate de sanguinarine) et de l'indole (chl. d'ibogaïne, chl. d'harmine). Rappelons que la cépharanthine et l'isotétrandrine sont extraits de divers *Stephania* (Ménispermacées), la berbérine de *Berberis vulgaris* (Berbéridacées), la

TABLEAU V. — **Activité de quelques alcaloïdes par rapport à celle du phénol.**

	<i>Staphyl. aureus</i>	<i>Pseudom. aeruginosa</i>	<i>Esch. coli</i>	<i>B. mesentericus</i>	<i>B. proteus</i>	<i>Eberth. typhosa</i>	<i>Klebs. pneumoniae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
Sanguinarine	50			33				8
Xanthofagarine				35				
Apomorphine	28	3,5	3,5	2	11,6	5	5	35,7
Harmine.	7,1	2,8	7,5	4	7,5	11,6	7,5	11,6
Cépharanthine.	1,4		6,4	16,5	1,5	2,3	3	3,5
Isotétrandrine	2,8	3,5	7,5	4,1	7,5	5,8	7,5	8,3
Berberine	6,1	0,5	1,5	3,5	0,6	0,5	0,4	3,5
Ibogaïne.	1,4	0,9	1,5	3,5	1,5	2,3	1,5	1,6
Quinine	0,86	0,15	1,5	3,5	1,5	2,3	1,5	1,6
Yohimbine.	0,5		1	1	0,5	0,77	0,64	0,7
Corynanthine	0,86		1,28	0,83	0,64	1,4	0,64	1

TABLEAU VI. — **Activité de quelques alcaloïdes par rapport à celle du quinosol.**

	<i>Staphyl. aureus</i>	<i>Pseudom. aeruginosa</i>	<i>Esch. coli</i>	<i>B. mesentericus</i>	<i>B. proteus</i>	<i>Eberth. typhosa</i>	<i>Klebs. pneumoniae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
Sanguinarine	0,44			0,16				0,05
Xanthofagarine				0,57				
Apomorphine	0,26	1,28	0,21	0,04	1	0,10	0,10	0,21
Harmine.	0,025	1,10	0,25	0,06	0,66	0,33	0,40	0,26
Cépharanthine.	0,005		0,20	0,20	0,13	0,05	0,16	0,05
Isotétrandrine	0,01	1,40	0,23	0,06	0,66	0,16	0,40	0,10
Berberine	0,021	0,20	0,04	0,05	0,05	0,01	0,02	0,05
Ibogaïne.	0,005	0,33	0,04	0,05	0,13	0,06	0,08	0,02
Quinine	0,004	0,06	0,04	0,05	0,13	0,06	0,08	0,02

sanguinarine du *Sanguinaria canadensis* (Papavéracées), l'ibogaïne de *Tabernanthe iboga* (Apocynacées) et l'harmine de *Peganum harmala* [Rutacées] (2). Cependant, dans chacun de ces groupes, on rencontre des alcaloïdes dépourvus d'activité bactériostatique dans les conditions adoptées ; ainsi, dans le groupe du phé-

(2) Nous devons ces alcaloïdes à l'amabilité de M. le professeur Paris qui a bien voulu nous les procurer, aux dépens de sa collection ; nous lui adressons nos remerciements.

TABLEAU VII. — Coefficients exprimant l'activité bactériostatique de quelques alcaloïdes par rapport à celle de la quinine.

	<i>Staphyl. aureus</i>	<i>Pseudom. aeruginosa</i>	<i>Esch. coli</i>	<i>B. mesentericus</i>	<i>B. proteus</i>	<i>Eberth. typhosa</i>	<i>Klebs. pneumoniae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
Sanguinarine	55			7,7				5
Apomorphine	33	21	4,2	0,46	10	2	4,2	21
Xanthofagarine				10				
Harmine	8,3	16	5	1,1	5	5	5	10
Cépharanthine	1,6		4,2	4,6	1	1	2	2
Isotétrandrine	3,3	21	5	1,1	5	2,5	5	5
Berberine	7	3	1	1	0,4	0,2	0,27	0,2
Ibogaine	4,6	5	1	1	1	1	1	1
Corynanthine	1		0,8	0,23	0,4	0,6	0,4	0,6

thrène, morphine, codéine, dionine et héroïne n'ont manifesté aucune activité jusqu'à une concentration de 10 g pour 1 000 cm³. La boldine, pourvue également d'un noyau phénanthrénique, s'est montrée active, parfois à des concentrations de l'ordre de 1,50 à 5,50 g pour 1 000 cm³. De même dans le groupe des alcaloïdes de l'indole, le sulfate d'ésérine s'est montré dépourvu d'activité jusqu'à la concentration de 5 g p. 1 000. Parmi les alcaloïdes à noyau isoquinoléique, les concentrations mises en expérience pour certains corps (narcéine, papavérine) ont été limitées par la faible solubilité dans les milieux de culture ; la mescaline et la narcotine ont été essayées jusqu'à 5 et 10 g par litre sans résultats. Parmi les alcaloïdes à noyau non hétérocyclique, aucun corps n'a manifesté d'activité bactériostatique. Dans le groupe de la pyridine, seule la nicotine a montré une légère activité pour des concentrations variant de 6 à 12 g pour 1 000 cm³. Dans le groupe du tropane, seule, l'hyosciamine a manifesté une activité bactériostatique qui est à peu près de l'ordre de celle de la nicotine. Les alcaloïdes du groupe de la purine, la novocaïne et ses sels se sont montrés très peu actifs, ils retardent le développement des bactéries sans l'inhiber totalement. Du groupe du nor lupinane, nous avons étudié la spartéine qui n'a manifesté d'activité qu'à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa*, de *B. proteus* et de *Shigella dysenteriae*. La pilocarpine, seul corps à noyau glyoxalique que nous avons étudié, n'a manifesté aucune activité bactériostatique pour des concentrations de 10 à 20 g pour 1 000 cm³ de milieu de culture.

3° Les alcaloïdes pourvus de propriétés bactériostatiques ont présenté un certain degré de spécificité ; ainsi le chlorhydrate

d'apomorphine s'est montré particulièrement actif à l'égard de *Shigella dysenteriae* et de *Staphylococcus aureus*, le chlorhydrate de cépharanthine, le nitrate de sanguinarine et la xanthofagarine à l'égard de *B. mesentericus*. Pour mettre ce fait en évidence, nous indiquons dans le tableau VIII l'ordre de sensibilité décroissante de différentes espèces bactériennes à l'égard des alcaloïdes étudiés. Nous avons souligné le nom des espèces pour lesquelles cette activité s'exerce à des taux inférieurs ou égaux à 1 g p. 1 000.

TABLEAU VIII. — **Sensibilité de différentes espèces bactériennes**
(par ordre décroissant).

Sanguinarine . . .	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>B. mesentericus</i> . <i>Shigella dysenteriae</i> .
Apomorphine . . .	<i>Shigella dysenteriae</i> . <i>St. aureus</i> . <i>B. proteus</i> . <i>B. pyocyannique</i> , Colibacille, Pneumobacille. <i>B. mesentericus</i> .
Harmine	<i>Shigella dysenteriae</i> . <i>Eberthella typhosa</i> . <i>St. aureus</i> , Colibacille, <i>B. mesentericus</i> , <i>B. proteus</i> , Pneumobacille.
Cépharanthine . . .	<i>B. mesentericus</i> . <i>Shigella dysenteriae</i> , Colibacille. Pneumobacille, <i>Eberth. typhosa</i> . <i>St. aureus</i> , <i>B. proteus</i> .
Isotétrandrine . . .	<i>Shigella dysenteriae</i> . Colibacille, <i>B. mesentericus</i> , <i>B. proteus</i> , <i>Eberth. typhosa</i> et Pneumobacille. <i>B. pyocyannique</i> . <i>St. aureus</i> .
Berbérine	<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>B. mesentericus</i> , <i>St. aureus</i> . Colibacille. <i>B. pyocyannique</i> . <i>Eberth typhosa</i> , <i>B. proteus</i> . Pneumobacille.
Ibogaïne	<i>B. mesentericus</i> . <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Eberth. typhosa</i> . <i>St. aureus</i> , <i>B. pyocyannique</i> , Colibacille, <i>B. proteus</i> et Pneumobacille.
Quinine	<i>B. mesentericus</i> . <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Eberth. typhosa</i> . <i>B. proteus</i> , Pneumobacille, Colibacille. <i>St. aureus</i> . <i>B. pyocyannique</i> .
Xanthofagarine . . .	<i>B. mesentericus</i> .

Quinosol	<i>St. aureus</i> . <i>B. mesentericus</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> . <i>Eberth. typhosa</i> . Colibacille. Pneumobacille. <i>B. proteus</i> <i>B. pyocyaneus</i> .
Phénol	<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>B. pyocyaneus</i> , <i>B. mesentericus</i> . <i>Eberth. typhosa</i> . <i>St. aureus</i> . Colibacille, <i>B. proteus</i> , Pneumobacille.

On peut noter que *Shigella dysenteriae* et *B. mesentericus* se sont généralement montrés les plus sensibles, comme ils le furent d'ailleurs à l'égard du quinosol. Le nitrate de sanguinarine, le sulfate de berbérine et le chlorhydrate d'apomorphine sont les seuls qui aient manifesté une activité particulière vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Le bacille pyocyaneus, qui est connu par sa faible sensibilité aux substances antibiotiques, paraît également peu sensible à l'action des alcaloïdes. Le phénol, par contre, s'est montré peu spécifique puisque les concentrations inhibitrices n'ont varié que de 1,25 à 2,25 g pour 1 000 cm³; les germes les plus sensibles à son action ont été *B. mesentericus* et *Shigella dysenteriae*. Le bacille pyocyaneus s'est montré aussi sensible que ces deux germes à l'action du phénol.

4° Il faut noter que les corps étudiés ont entraîné une augmentation parfois importante de la phase de latence. Certaines concentrations ont retardé le départ des cultures jusqu'à la vingt-quatrième heure ou même jusqu'à la quarante-huitième heure. Aussi avons-nous adopté, pour déterminer les doses bactériostatiques, une durée d'observation de trois jours, temps après lequel nous avons très rarement observé un début de culture.

5° Il est apparu que certaines substances alcaloïdiques peuvent, aux concentrations utilisées en thérapeutique sous forme de solutés injectables, sans être bactéricides, exercer une certaine activité bactériostatique à l'égard des bactéries susceptibles de les polluer. Cette bactériostase peut être la source d'erreur, lorsqu'on recherche l'état aseptique de tels solutés alcaloïdiques selon les indications prescrites par la Pharmacopée [49].

II. — RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE A L'ÉGARD DE *Mycobacterium tuberculosis* (SOUCHE BRÉVANNES).

La méthode des dilutions en séries a été utilisée pour les essais. Le milieu de culture était le milieu de Sauton additionné extemporanément de sérum de cheval (1/25) [34]. Les essais étaient effectués dans des tubes à essai de 20 mm x 20 cm contenant

10 cm³ de milieu de culture additionné de concentrations variables du produit à l'étude ; chacun des tubes était ensemencé avec 0,20 cm³ d'une culture de bacille de Koch (souche Brévannes) en milieu Sauton-sérum à +37° C, âgée de 3 semaines, et mis à incuber à l'étuve en position inclinée.

Les doses bactériostatiques indiquées dans le tableau IX sont exprimées en grammes d'alcaloïde pour 1 000 cm³ de milieu de culture, elles représentent la moyenne entre la plus forte concentration qui n'a pas empêché le développement de *Mycobacterium tuberculosis* et la plus faible concentration qui a inhibé le développement pendant six semaines ; au delà de ce délai, nous n'avons jamais observé de culture tardive. Nous indiquons également la concentration bactériostatique de la thiosemicarbazone de l'acétaminobenzaldéhyde ou Tb 1 pris comme terme de comparaison.

TABLEAU IX. — **Activité bactériostatique de quelques alcaloïdes à l'égard de *Mycobacterium tuberculosis* (souche Brévannes).**

Milieu Sauton-sérum.

SUBSTANCE TÉMOIN	GRAMMES POUR 1 000 CM ³	
	0,035	1/28 500
Tb 1		
Harmine (chl.)	0,025	1/40 000
Alcaloïdes totaux de l'holarrhène (bromh.)	0,075	1/13 300
Apomorphine (chl.)	0,15	1/6 600
Berberine (sulfate)	0,15	
Isotétrandrine (acétate)	0,15	
Morphine (chl.)	0,30	1/3 300
Corynanthine (chl.)	0,35	1/2 850
Emétine (Chl.)	0,35	
Conessine (bromh.)	1,25	1/800
Strychnine (chl.)	1,25	
Xanthofagarine	> 0,20	
Cocaïne (chl.)	> 2	

Seule l'harmine s'est montrée douée d'une activité bactériostatique notable. Aussi nous a-t-il semblé intéressant d'étudier son activité *in vivo* dans la tuberculose expérimentale du cobaye. Les résultats détaillés de ces essais ont été exposés [20]. Notons simplement ici que les résultats des essais *in vivo* n'ont pas confirmé ceux de l'essai *in vitro*. La toxicité du chlorhydrate d'harmine semble au contraire avoir accéléré l'évolution de l'infection aux doses mises en expériences.

III. — RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ BACTÉRICIDE.

L'existence d'une éventuelle action bactéricide a été recherchée pour quelques alcaloïdes. La technique adoptée fut celle des

dilutions en milieux liquides. Dans une série de tubes à essai, furent introduites des doses décroissantes de solutions alcaloïdiques sous un volume constant de 5 cm³. Dans chaque tube était ajoutée une quantité fixe de la suspension microbienne en essai de titre connu, et après des temps de contact de quinze et de trente minutes, nous avons prélevé 0,10 cm³ de chaque dilution qui fut transportée dans une série de tubes à essai renfermant 5 cm³ de bouillon de subculture. Dans le cas des alcaloïdes à l'étude, nous avons pu établir que la dose d'alcaloïde ainsi transportée dans la subculture en même temps que les germes est fort voisine de celle qui réalise une concentration bactériostatique ou même qu'elle la dépasse. La subculture se trouve donc inhibée, bien que les germes présents puissent être encore vivants après l'action limitée de l'alcaloïde. Cet écueil est connu de tous les bactériologistes qui pratiquent l'essai *in vitro* des substances antiseptiques [18] et diverses méthodes ont été proposées pour tenter d'y remédier (dilution du prélèvement, neutralisation chimique, centrifugation et lavages des germes traités, addition ultérieure de germes vivants, utilisation des techniques des porte-germes). L'activité bactéricide de l'alcaloïde, lorsqu'elle a pu être déterminée sans cause d'erreur, s'est montrée trop faible pour justifier la poursuite de ces recherches.

Notons à titre d'exemple que le sulfate de berbérine en solution saturée n'a manifesté aucune action sur *Staphylococcus aureus*, pas plus que le chlorhydrate d'harmine en solution à 1 p. 100 après trente minutes de contact. La xanthofagarine en solution saturée était totalement inactive sur *Esch. coli* et *B. mesentericus* en trente minutes (par contre, *St. aureus* a été tué par la même solution dans ce même temps).

IV. — RECHERCHE D'UNE ÉVENTUELLE ACTION STIMULANTE DE QUELQUES ALCALOÏDES SUR *Staphylococcus aureus*.

Les substances alcaloïdiques n'exercent-elles pas, à certaines concentrations, à l'image de nombreuses substances physiologiquement actives, une action stimulante sur la croissance des cultures bactériennes ? Pour répondre à cette question, nous avons établi les courbes de multiplication microbienne dans un milieu liquide relativement pauvre renfermant des doses décroissantes d'alcaloïdes reconnus bactériostatiques ou d'usage courant, en suivant la progression de l'opacité des cultures à l'électrophotomètre de Meunier. Les concentrations alcaloïdiques mises en expérience s'échelonnaient depuis les concentrations inhibitrices précédemment déterminées jusqu'aux doses infinitésimales de l'ordre de 1/1 000 de µg pour 1 000 cm³ de milieu.

Le milieu utilisé était le milieu à l'hydrolysate de caséine dont nous avons indiqué la composition ci-dessus. Les cultures ont été

faites dans des fioles permettant d'effectuer la lecture au photomètre sans transvasements réitérés. La suspension bactérienne était préparée au moment de l'essai, à partir d'une culture de *St. aureus* (souche +) âgée de 24 heures et cultivée à + 37° C sur gélose inclinée. L'ensemencement initial de 10 000 000 de cocci par centimètre cube, jusqu'alors adopté, dut être abandonné, l'opacité du milieu dépassant trop vite la zone de sensibilité de l'électrophotomètre; après des essais d'orientation, nous nous sommes arrêtées finalement à la concentration de 500 000 germes par centimètre cube, nombre qui nous a permis de suivre facilement les différentes phases de la culture.

Les solutions d'alcaloïdes étaient préparées en eau distillée stérile. Dans une série de fioles d'Erlenmeyer à réservoir latéral, préalablement stérilisées, nous répartissions aseptiquement :

Milieu de culture à l'hydrolysate de caséine (à double concentration)	10 cm ³
Suspension microbienne (50 000 000 germes/cm ³)	0,20
Solution d'alcaloïde	Quantités décroissantes.
Eau distillée.	Q.S.P. 20 cm ³

Le contenu de chaque fiole était étalonné à l'électrophotomètre et les fioles placées à l'étuve à 37° C. Toutes les deux ou trois heures, une lecture néphélométrique était effectuée.

Nous avons étudié ainsi l'influence sur le développement du *Staphylocoque* des substances suivantes aux concentrations ci-dessous indiquées :

Cocaïne (chl.)	De 10 g à 1×10^{-10} g pour 1 000 cm ³
Harmine (chl.)	De 0,50 g à 1×10^{-10} g pour 1 000 cm ³
Morphine (chl.)	De 5 g à 1×10^{-10} g pour 1 000 cm ³
Xanthofagarine (base)	De 5×10^{-4} à 1×10^{-12} g pour 1 000 cm ³
Berberine (sulf.)	De 1×10^{-4} à 1×10^{-12} g pour 1 000 cm ³
Emétine (chl.)	De 3×10^{-4} à 1×10^{-13} g pour 1 000 cm ³
Quinine (chl.)	De 1×10^{-3} à 1×10^{-10} g pour 1 000 cm ³
Strychnine (sulf.)	De 2×10^{-5} à 1×10^{-12} g pour 1 000 cm ³
Caféine	De 1 g à 1×10^{-7} g pour 1 000 cm ³
Atropine (sulf.)	De 1×10^{-5} à 1×10^{-8} g pour 1 000 cm ³
Cépharanthine (chl.)	De 2×10^{-5} à 2×10^{-9} g pour 1 000 cm ³

En diminuant progressivement les concentrations des substances alcaloïdiques, nous obtenions un développement un peu moins intense que celui de la culture témoin, mais nous n'avons jamais observé la stimulation de la culture recherchée. Les doses infinitésimales mises en jeu n'agissaient plus aucunement sur les germes : à des concentrations de l'ordre de 1/1 000 de μ g pour 1 000 cm³, les alcaloïdes n'ont favorisé en aucune façon le développement du *Staphylocoque*.

Notre recherche d'une éventuelle action stimulante exercée par les alcaloïdes sur les bactéries s'est montrée négative dans les conditions adoptées. Aucun des produits que nous avons essayés,

agissant à de très petites doses, n'a permis d'obtenir un développement accéléré de *Staphylococcus aureus* dans les conditions de l'essai.

V. — REMARQUES SUR QUELQUES VARIATIONS MORPHOLOGIQUES DES BACTÉRIES CULTIVÉES EN PRÉSENCE DE SUBSTANCES ALCALOÏDIQUES.

Au cours des essais précédemment décrits, nous avons eu l'occasion d'observer certaines modifications dans la morphologie des bactéries cultivées en présence de substances alcaloïdiques. De telles modifications ont déjà été signalées, dès longtemps, pour des bactéries soumises à l'action de diverses substances antiseptiques (Guignard et Charrin [12], Peju et Rajat [30] et plus récemment A. Desvignes [9]).

Elles ont été retrouvées avec les substances antibiotiques (S. A. Waksman [39], A. D. Gardner [41], R. Tulasne et ses collaborateurs [37], A. J. Shanahan et F. W. Tanner [31], L. Dienes [40], C. Levaditi et ses collaborateurs [22], M. Welsh et ses collaborateurs [40]). V. Soituz [33] a signalé certaines modifications morphologiques de bactéries soumises à l'action de différents alcaloïdes.

Pour notre part, nous avons recherché l'existence de modifications morphologiques de 5 espèces bactériennes cultivées en présence de doses subbactériostatiques des alcaloïdes à l'étude et colorées par la technique de Gram (*Staphylococcus aureus* +, *Pseudomonas aeruginosa* I, *Escherichia coli* Samet, *Bacillus mesentericus vulgatus* 100, *Bacillus proteus* X 19). Nous n'avons observé que des modifications assez discrètes rappelant celles qui sont observables en présence de substances antibiotiques et se traduisant par l'apparition de formes géantes et de condensations protoplasmiques.

Le Staphylocoque est peu influencé, tout au plus avons-nous noté l'apparition de quelques cocci plus volumineux que les cocci non traités, en particulier en présence de scurocaïne, de sulfate d'hyosciamine, de chl. d'harmine. Par contre, avec *Bacillus mesentericus* nous avons pu observer l'apparition à peu près constante de formes filamenteuses plus ou moins longues et enchevêtrées extrêmement différentes du type normal. Avec les autres espèces bactériennes, les modifications, parfois nettes, ont toujours été beaucoup moins accusées.

CONCLUSION.

La recherche de l'activité bactériostatique de 58 substances alcaloïdiques, parmi lesquelles figurent des dérivés récemment isolés, nous a permis de constater que si la plupart d'entre elles ne sont pas ou sont peu actives sur les bactéries mises en expérience,

quelques-unes possèdent une certaine activité bactériostatique, à savoir : les chlorhydrates d'apomorphine, d'harmine, de cépharanthine, d'ibogaïne et de quinine, le nitrate de sanguinarine, l'acétate d'isotétrandrine, la xanthofagarine et le sulfate de berbérine. Cette action se manifeste notamment par une prolongation accusée de la phase de latence.

La recherche d'une éventuelle action stimulante des alcaloïdes sur le développement d'une culture de *Staphylococcus aureus* s'est montrée négative, même pour les dilutions de l'ordre de 1×10^{-12} g par litre.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] T. H. AMAKO. *Centralbl. Bakt.*, 1931, **119**, 464.
- [2] J. BERNARD. *Thèse Pharm.*, Paris, 1953.
- [3] P. BERNOUILLI. *Schweiz. Zeitschr. allgem. Path. Bakt.*, 1944, **7**, 525.
- [4] R. BIELING. *Biochem. Zeitschr.*, 1918, **85**, 188.
- [5] E. BONETTI et A. ILLENYI. *Centralbl. Bakt.*, 1941-1942, **148**, 114.
- [6] E. BRIGANDAT. *Thèse Pharm.*, Montpellier, 1891.
- [7] O. H. BROWN. *Proceed. Amer. Soc. biol. Chem.*, 1912, 36, in *Bull. Inst. Pasteur*, 1912, **10**, 479.
- [8] H. J. CORPER, H. GAUSS et O. B. REUSCH. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1921-1922, **5**, 643.
- [9] A. DESVIGNES. *Thèse doct. Pharm.*, Paris, 1952.
- [10] L. DIENES. *J. Bact.*, 1949, **57**, 529.
- [11] A. D. GARDNER. *Nature*, 1940, **146**, 837.
- [12] GUIGNARD et CHARRIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1889, **105**, 1192.
- [13] A. HAIM et TORRES. *Centralbl. Bakt.*, 1927, **102**, 96.
- [14] F. H. JOHNSON et I. LEWIN. *Science*, 1945, **101**, 281.
- [15] C. C. JOHNSON, G. JOHNSON et C. F. POE. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 1948, **4**, 265 ; 1949, **5**, 222-230 ; 1952, **8**, 71. — F. G. DROMMOND, C. C. JOHNSON et C. F. POE. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 1950, **6**, 235.
- [16] L. KARWACKI et S. BIERNACKI. *Ces Annales*, 1925, **39**, 476.
- [17] W. KOLLE et H. SCHLOSSBERGER. *Zeitschr. Hyg.*, 1923, **100**, 107.
- [18] S. LAMBIN. *Thèse doct. Sci.*, Masson, édit., Paris, 1933.
- [19] S. LAMBIN et J. BERNARD. *Acad. Pharmacie*, séance du 15 avril 1953.
- [20] S. LAMBIN et J. BERNARD. *Soc. Biol.*, séance du 25 avril 1953.
- [21] S. LAMBIN et M. ROBERT. *Ann. Pharm. franç.*, 1951, **9**, 103.
- [22] C. LEVADITI et J. HENRI. *Revue Immunol.*, 1948, **12**, 193. — C. LEVADITI, A. VAISMAN et J. HENRY-EVENO. *La Presse Méd.*, 1950, **58**, 665.
- [23] A. J. LEVY. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1931, **23**, 733-739.
- [24] A. LODE et A. HOWARD. *Centralbl. Bakt.*, 1932, **124**, 538.
- [25] A. LOESER. *Zeitschr. Immunitätsf.*, **25**, 140, in *Bull. Inst. Pasteur*, 1917, **15**, 159.
- [26] LUBBERT. *Biologische Spaltpilzuntersuchungen*, 1886, cité par HAIM et TORRES. *Centralbl. Bakt.*, 1927, **102**, 96.
- [27] J. MORGENROTH et I. TUGENDREICH. *Berlin. klin. Wochenschr.*, juillet 1916, 794, in *Bull. Inst. Pasteur*, 1917, **15**, 159.
- [28] F. OBATON. *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **208**, 1536.

- [29] R. PARIS et A. GERMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 2345.
- [30] PEJU et RAJAT. *C. R. Soc. Biol.*, 1906, **60**, 468, 494, 628.
- [31] A. J. SHANAHAN et F. W. TANNER. *J. Bact.*, 1948, **55**, 537.
- [32] SHU CHUNG LU et LAN TIEN HO. *Trans. chin. Assoc. adv. Sci.*, 1947, **9**, in *Proc. Pharm.*, 1949, **4**.
- [33] V. SOITUZ. *Rev. Path. Comp.*, 1930, **30**, 910.
- [34] SOLOMIDÈS. *Ces Annales*, 1949, **76**, 371.
- [35] W. S. SSADIKOW. *Centralbl. Bakt.*, 1911, **60**, 417.
- [36] J. P. TODD et H. L. SMITH. *J. royal techn. Coll.*, janvier 1934, **3**.
- [37] R. TULASNE et R. MINCK. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 2186. — R. TULASNE, R. MINCK et A. MINCK. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1014 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 1262. — R. TULASNE et R. VENDRELY. *Nature*, 1940, **146**, 837-838.
- [38] B. VAINBERG et V. KRASNOGOLOVEZ. *Z. Mikrobiol.*, 1938, **21**, 121, in *Berichte gesamt. Physiol.*, 1939, **114**, 508.
- [39] S. A. WAKSMAN. *Antagonismes microbiens et substances antibiotiques*, 1948.
- [40] M. WELSH, E. NIHOUL et C. DELEMENNE-JAMINON. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1452.

LE GLYCOGÈNE INTRALEUCOCYTAIRE ET SES VARIATIONS AU COURS DE LA PHAGOCYTOSE

par SUZANNE BAZIN, ALBERT DELAUNAY et CLAUDE AVICE (*).

(C. N. R. S., Institut Pasteur, annexe de Garches.
Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Microbiologie.)

INTRODUCTION.

La multiplication des recherches biochimiques dans le domaine de la physiologie a révélé l'importance du rôle des polysides dans la production de nombreux phénomènes : ainsi, c'est un polyholoside, le glycogène, qui représente, dans l'organisme, l'une des principales sources énergétiques, utilisée en particulier pour la contraction musculaire.

Les études cytologiques ont montré, de leur côté, que le glycogène est abondant dans les cellules hépatiques et musculaires. On observe également sa présence dans des cellules d'origines diverses : épithéliums, cellules embryonnaires, cellules néoplasiques, etc. Enfin, on sait depuis longtemps que cette substance existe dans les leucocytes de la moelle, du sang, des exsudats et du pus [10].

Parmi les leucocytes de la moelle, les myéloblastes sont dépourvus de glycogène ; les myélocytes, au contraire, en contiennent une certaine quantité qui augmente avec la maturation des cellules jusqu'à la formation des polynucléaires adultes (M. Wachstein [12], R. Wagner [14]).

Dans le sang, lymphocytes, monocytes, mononucléaires ne renferment pas de glycogène [6] ; ce dernier est localisé dans les polynucléaires, à un taux variable selon les espèces animales et selon les individus d'un même lot, mais toujours assez faible (R. Wagner [13], R. Robineaux, S. Bazin et A. Delaunay [9]).

Dans les exsudats et le pus, enfin, les granulocytes sont chargés de glycogène, avec une abondance qui a frappé depuis longtemps tous les observateurs. De tels faits mettent en évidence d'importantes variations dans la teneur des leucocytes en glycogène. Mais quelle est la signification de ces variations ? On ne le sait pas

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1953.

encore. En particulier, on ignore pourquoi le leucocyte inflammatoire est si riche en glycogène. Cette constatation a cependant conduit à deux hypothèses :

1° Cette glycogénèse, accrue au moment où les leucocytes quittent le courant sanguin par diapédèse et se rassemblent dans les exsudats, serait le signe d'une dégénérescence, analogue à la dégénérescence amyloïde. Cette opinion, soutenue par les anciens auteurs, interprète la présence simultanée, dans les pus, d'une forte quantité de glycogène et d'une importante proportion de leucocytes altérés, en voie de lyse, comme deux phénomènes liés à la sénescence des cellules.

2° Pourtant, compte tenu de la rapidité de la production de cette réserve glycogénique, on éprouve quelque peine à admettre qu'on se trouve en présence d'un processus dégénératif. Ne s'agirait-il pas plutôt d'une activité cellulaire augmentée ? Effectivement cette hypothèse a déjà été émise par P. Ehrlich [4], puis par J. de Haan [7]. R. Willstätter et M. Rohdewald [17] ont également soutenu une opinion analogue ; d'après ces auteurs, qui ont étudié la formation d'acide lactique par les leucocytes, les diastases leucocytaires sont capables d'effectuer les mêmes dégradations glucidiques que les diastases musculaires.

En faveur de cette hypothèse, d'autres arguments ont été fournis par les expériences de W. Fleischmann [5] : des leucocytes d'exsudats de lapin, soumis à l'anaérobiose par action de l'acide cyanhydrique, présentent des mouvements amiboïdes et un pouvoir phagocytaire normaux. Ici, le métabolisme glycolytique est cependant seul à assurer les dépenses énergétiques de la cellule.

A notre avis, le glycogène pourrait jouer, pour l'activité leucocytaire, le même rôle que pour l'activité musculaire. Mais si le glycogène accumulé dans les cellules inflammatoires est bien la principale source énergétique dont disposent ces cellules, on doit pouvoir constater une importante diminution de cette réserve glucidique lorsque les leucocytes sont en activité, c'est-à-dire lorsqu'ils exercent leur pouvoir phagocytaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris les expériences suivantes : 1° détermination du taux de glycogène dans un lot de polynucléaires inflammatoires ; 2° mise en présence de ces polynucléaires d'un germe phagocytale ; 3° détermination du taux de glycogène, chez ces mêmes cellules, après la phagocytose.

TECHNIQUE. — Pour nos expériences, nous avons étudié spécialement la phagocytose de trois germes différents : *Staphylococcus albus*, *Bacillus anthracis*, *Eberthella typhi*, par des polynucléaires inflammatoires de cobaye.

Nous avons choisi ces trois espèces bactériennes en raison de leurs différences morphologiques et tinctoriales, et surtout parce

qu'elles se distinguent par leur aptitude à être phagocytées. *Staphylococcus albus* et *Bacillus anthracis* sont aisément phagocytés, alors que *Eberthella typhi*, de souche smooth, l'est beaucoup moins.

Les phagocytes utilisés étaient des polynucléaires de cobaye provenant d'exsudats péritonéaux aseptiques, obtenus par notre technique habituelle [2]. Ce procédé permet d'obtenir des cellules faciles à manier et en bon état de conservation. Pour l'étude que nous poursuivions, ces cellules inflammatoires riches en glycogène nous ont paru particulièrement indiquées.

Les exsudats ont été centrifugés à faible vitesse, et le culot leucocytaire obtenu a été remis en suspension dans du sérum frais de cobaye au 1/2, à une concentration voisine de 20 000 cellules au millimètre cube, concentration déterminée par une numération après dilution.

Cette suspension de leucocytes a été répartie, sous le volume de 1 ml, dans 4 tubes :

1° Au tube n° 1, nous avons ajouté immédiatement 2 ml de potasse à 30 p. 100 et nous avons continué les opérations nécessaires au dosage du glycogène ;

2° Au tube n° 2, nous avons ajouté 1 ml de soluté isotonique de chlorure de sodium ;

3° Aux tubes n°s 3 et 4, nous avons ajouté 1 ml d'une suspension bactérienne titrée, en eau physiologique, provenant de cultures sur gélose de vingt-quatre heures.

Les tubes n°s 2, 3 et 4 ont été mis à l'étuve à 37°, et retirés après trente minutes. Les tubes n°s 2 et 3 (cellules n'ayant pas ou ayant phagocyté) ont reçu la potasse, puis ont été traités pour le dosage du glycogène. Le tube n° 4 a été utilisé pour faire des frottis sur lames qui devaient nous permettre d'apprécier l'intensité de la phagocytose.

L'isolement et la purification du glycogène ont été pratiqués selon la technique de E. Pflüger [8] modifiée par R. Wagner [13] pour les petites quantités de glycogène ; ces opérations comportent : une hydrolyse d'une heure en présence de potasse à 30 p. 100, une précipitation par l'alcool à 70°, puis deux redissolutions successives dans l'eau bidistillée à chaud, suivies de nouvelles précipitations alcooliques. Les particules ténues de glycogène se forment lentement ; aussi chaque précipitation a-t-elle dû être poursuivie pendant un séjour d'au moins douze heures à 4°.

Le précipité de glycogène, rassemblé par centrifugation, a été ensuite dissous dans l'acide sulfurique N/2, et soumis à une hydrolyse de trois heures. Le glucose formé a été alors dosé par la technique de M. Somogyi [11] sur une partie de l'hydrolysât, préalablement neutralisé en présence de rouge de phénol. Les

résultats, exprimés en μg de glucose, ont été rapportés à 1 000 000 de leucocytes.

Pour ce dosage, deux vérifications ont été effectuées :

1° Les hydrolysats, sur lesquels se font les titrages de glucose, mis en fermentation par la levure, ont perdu plus de 95 p. 100 de leurs substances réductrices. La réduction, par ces hydrolysats, du sel de cuivre contenu dans le réactif de Somogyi est donc bien due au glucose provenant du glycogène initial, et non à des substances réductrices d'autre origine.

2° Les suspensions bactériennes, aux concentrations où elles ont été ajoutées aux leucocytes, n'ont pas fourni de substances réductrices dosables. Les titrages de glucose, effectués sur l'hydrolysat provenant du tube n° 3, ayant contenu leucocytes et bactéries, ont donc donné des résultats correspondant au glycogène leucocytaire seul.

L'estimation du pouvoir phagocytaire des leucocytes a été pratiquée par l'examen des frottis colorés au bleu de méthylène, en établissant le pourcentage de cellules ayant phagocyté. Dans certains cas, les résultats ont été précisés par la détermination d'un index phagocytaire, c'est-à-dire du nombre moyen de germes phagocytés par une cellule (moyenne établie sur 1 000 cellules).

RÉSULTATS.

1° TENEUR DES LEUCOCYTES D'EXSUDATS EN GLYCOGÈNE. — Le taux du glycogène intraleucocytaire des cellules inflammatoires a été trouvé assez élevé : 12 à 18 μg , en moyenne, pour 1 000 000 de leucocytes. Ce résultat confirme nos précédentes recherches sur la surcharge glycogénique des leucocytes d'exsudat, par rapport aux leucocytes du sang circulant [9].

Mais cette teneur glycogénique varie assez largement d'un animal à l'autre. Sans doute doit-on tenir compte de l'influence des saisons, du régime alimentaire, de l'état nutritionnel et hormonal des animaux, etc. [4]. Cependant, pour nos expériences, réalisées *in vitro*, ces différences individuelles interviennent peu, puisque nous comparons les leucocytes d'un même animal, les uns au repos, les autres en activité, tous deux appartenant au même prélèvement.

2° STABILITÉ DU GLYCOGÈNE INTRALEUCOCYTAIRE. — Dans nos leucocytes en bon état de conservation, la teneur en glycogène n'a pas varié entre le moment de l'extraction des cellules et la fin du séjour à l'étuve (en milieu sérique stérile : taux de glycogène identique dans les tubes n°s 1 et 2).

Pour les leucocytes inflammatoires, contrairement à ce qu'on observe pour les fragments d'organes, tels que le foie, l'extraction de l'organisme n'entraîne pas une glycogénolyse rapide,

à condition que les cellules soient maintenues dans un milieu physiologique convenable [4]. Cette stabilité du glycogène intra-leucocytaire permet donc une étude du métabolisme de ce polyside dans des cellules en travail *in vitro*.

3° MODIFICATIONS DE LA TENEUR GLYCOGÉNIQUE DES LEUCOCYTES PAR LA PHAGOCYTOSE DE BACTÉRIES. — a) *Staphylococcus albus* : Les suspensions bactériennes contenaient 800 000 000 de germes au millilitre. Les résultats des différents essais sont rapportés dans le tableau I.

TABLEAU I

Glycogène en μg rapporté à 1 million de leucocytes			% de glycogène utilisé	Importance de la phagocytose
Avant phagocytose	Après phagocytose	Consommé pendant la phagocytose		
11,3	10	1,3	11,5	96 %
11,3	10	1,3	11,5	97 %
13,1	10,9	2,2	17	97 %
13,5	12,2	1,3	8,9	71 %
13,5	11	2,5	20	80 %
13,6	11	2,6	19,1	92 %
13,9	11,6	2,3	15,1	75 %
14	12	2	14,6	65 %
14	10	4	28,5	73 %
16,7	11,6	5,1	30,5	94 %
18,5	15,6	2,9	16,6	78 %
19,1	11	8,1	42,3	96 %
19,4	16,3	3,1	16	71 %
20	15,5	4,5	27,5	91 %
21,5	20	1,5	7	81 %
23,6	19,4	4,2	17,8	97 %
28	25,4	2,6	9,4	62 %
29,8	29,5	0,3	1,1	68 %
32,4	10,9	21,5	66,5	98 %
32,5	21,4	11,1	34	58 %
Moyennes :				
19	14,8	4,2	20,8	82 %
($\sigma = \pm 6,9$)	($\sigma = \pm 5,5$)	($\sigma = \pm 2,5$)		

L'examen de ce tableau fait ressortir une nette diminution du glycogène intracellulaire chez les leucocytes ayant phagocyté des staphylocoques.

Parmi les différents essais effectués, si l'on compare les phagocytoses les plus fortes (> 75 p. 100) aux phagocytoses les plus faibles (< 75 p. 100), on obtient les moyennes suivantes :

	PHAGOCYTOSE > 75 p. 100	PHAGOCYTOSE < 75 p. 100
Glycogène rapporté à 1 000 000 de leucocytes.		
Avant phagocytose	17,9	22,8
Après phagocytose	13	19,4
Disparu pendant la phagocytose.	4,9	3,4
Glycogène consommé p. 100	24	12,3
Phagocytose p. 100	91,4	66

On constate donc que la phagocytose la plus intense a provoqué une glycogénolyse plus forte.

b) *Bacillus anthracis* : Les suspensions bactériennes contenaient 700 000 000 de germes au millilitre.

Les résultats sont rapportés dans le tableau II.

TABLEAU II.

	GLYCOGÈNE EN μ G rapporté à 1 000 000 de leucocytes			GLYCOGÈNE utilisé p. 100	IMPORTANCE de la phagocytose p. 100
	Avant phagocytose	Après phagocytose	Consommé pendant la phagocytose		
13		9,5	3,5	24,2	80
13,7		12,2	1,5	11	78
13,6		11,9	1,7	12,5	70
11,2		5,8	5,4	47	67
12,4		9,7	2,7	21,6	90
10,5		9,1	1,4	13,3	87
Moyennes.	12,4 ($\sigma = \pm 1,18$)	9,7 $\sigma = \pm 2,1$	2,7 ($\sigma = \pm 0,7$)	21,6	79

L'examen de ce tableau montre que la phagocytose de bactéries charbonneuses, comme celle de staphylocoques, s'accompagne d'une glycogénolyse intraleucocytaire.

c) *Eberthella typhi*, de souche smooth : Les suspensions contenaient 1 000 000 000 de germes au millilitre.

Les résultats sont rapportés dans le tableau III.

Pour cette bactérie, la phagocytose a été faible et la glycogénolyse a été également peu marquée.

TABLEAU III.

	GLYCOGÈNE EN μG rapporté à 1 000 000 de leucocytes			GLYCOGÈNE utilisé p. 100	IMPORTANCE de la phagocytose p. 100
	Avant phagocytose	Après phagocytose	Consommé pendant la phagocytose		
	10,7	10,2	0,5	4,6	36
	11,6	10	1,6	13,8	34
	9,3	8,6	0,7	7,5	32
	13,1	13,3	0,8	6,3	12
	14	13,8	0,2	1,4	29
	15,5	14,8	0,7	8	30
Moyennes.	12,3 ($\sigma = \pm 2,3$)	11,5 ($\sigma = \pm 2,4$)	0,8 ($\sigma = \pm 0,28$)	6,9	29

CONCLUSIONS DE CES ESSAIS.

L'ensemble de ces essais montre que, indépendamment de la nature de la bactérie mise en expérience, la phagocytose entraîne une glycogénolyse intraleucocytaire.

Lorsque la phagocytose est importante (cas du staphylocoque et de la bactérie charbonneuse) la chute du taux du glycogène leucocytaire est forte.

Lorsque la phagocytose est faible (cas du bacille typhique smooth) la quantité de glycogène disparu pendant la phagocytose est également petite.

Il ressort donc de ces expériences que l'importance de la glycogénolyse leucocytaire paraît en rapport avec l'intensité de la phagocytose.

DISCUSSION.

Cette constatation, qui découle normalement de l'examen des moyennes obtenues dans les différents groupes d'expériences, ne se vérifie cependant pas régulièrement pour chacun des essais pris séparément. Ceci tient, à notre avis, aux imprécisions inévitables dans ce genre d'essais : 1° le dosage du glycogène, qui comporte de nombreuses manipulations, est finalement rapporté à 1 000 000 de leucocytes ; or, la quantité de cellules, contenues dans la prise d'essai, ne peut être évaluée que par une numération dont la précision, dans les meilleures conditions, ne peut excéder 10 p. 100 ; 2° l'appréciation de l'importance de la phagocytose n'est qu'approximative ; ni le pourcentage de cellules ayant phagocyté, ni l'index phagocytaire ne peuvent rendre compte exactement du phénomène ; celui-ci comporte en effet,

non seulement l'englobement des bactéries, mais encore les mouvements pseudopodiques qui précèdent et accompagnent cette ingestion et la digestion intracellulaire des germes, souvent précoce.

En raison de ces différences observées dans les résultats individuels, nous avons appliqué les calculs statistiques aux quantités de glycogène trouvées avant et après phagocytose. L'erreur standard σ , souvent assez élevée par suite des variations d'un animal à l'autre, est parfois un peu plus grande après la phagocytose, ce qui correspond à une utilisation irrégulière de la réserve glycogénique selon les lots de leucocytes. Les rapports critiques établis entre les séries de résultats obtenus avant et après phagocytose sont respectivement : 2,05 pour le staphylocoque, 3,3 pour la bactérie charbonneuse, 2,22 pour le bacille typhique. Pour les nombres d'essais effectués, ces valeurs montrent que les différences observées entre les taux de glycogène chez les leucocytes ayant ou non phagocyté sont statistiquement significatives.

Malgré la constante diminution du glycogène intraleucocytaire observée dans tous les essais, nous avons cherché à préciser nos résultats par un type d'expérience particulièrement démonstratif. Pour cela, nous avons mis au contact de leucocytes d'un même prélèvement : 1° une suspension de bacilles typhiques smooth ; 2° la même suspension de bacilles en présence d'un immunosérum riche en anticorps O (1) ; 3° l'immunosérum, sans suspension bactérienne. Après un séjour de trente minutes à 37°, nous avons dosé le glycogène dans ces différents groupes de leucocytes. (La présence d'anticorps O, comme on le sait, rend très active la phagocytose des bacilles typhiques smooth [3]). Les moyennes, portant sur 6 essais, sont rapportées dans le tableau IV.

Ces essais montrent que : 1° pour une phagocytose faible, en l'absence d'immunosérum, la glycogénolyse est faible, et 2° pour une phagocytose forte, en présence d'immunosérum, la glycogénolyse est importante.

Cette différence dans la consommation du glycogène ne peut être due qu'à la différence d'intensité de la phagocytose. En effet, dans les deux cas (absence ou présence d'immunosérum), le nombre de germes présents a été identique ; on ne peut donc attribuer l'augmentation de la glycogénolyse ni au contact entre bactéries et leucocytes, ni aux diastases bactériennes ayant pu diffuser dans le milieu. De même, la présence d'anticorps O n'a pas modifié le métabolisme glycogénique des leucocytes, car les leucocytes mis au contact de l'immunosérum ont fourni la même

(1) Nous remercions vivement M. le Dr Le Minor qui nous a aimablement fourni la souche d'*Eberthella typhi* et l'immunosérum correspondant.

TABLEAU IV.

	GLYCOGÈNE EN μ G rapportés à 1 000 000 de leucocytes			GLYCOGÈNE UTILISÉ p. 100	IMPORTANCE de la phagocytose	
	Avant phagocytose	Après phagocytose	Consommé pendant la phagocytose		Cellules ayant phagocyté p. 100	Index phagocytaire
Sans immunsérum.	12,3 ($\sigma = \pm 2,3$)	11,5 ($\sigma = \pm 2,4$)	0,8 ($\sigma = \pm 0,28$)	6,9	29	1,84
Avec immunsérum.	12,3 ($\sigma = \pm 3,2$)	9,5 ($\sigma = \pm 2,8$)	2,7 ($\sigma = \pm 0,5$)	23,7	83	13,6

quantité de glycogène que les leucocytes témoins maintenus dans du sérum normal.

Ces résultats confirment très nettement nos précédentes conclusions : 1° la phagocytose s'accompagne d'une glycogénolyse intraleucocytaire ; 2° la consommation de glycogène est d'autant plus forte que la phagocytose est plus importante.

Ces faits montrent donc que le glycogène est une source énergétique utilisée par les polynucléaires dans leur activité phagocytaire. Il est évident que d'autres réactions chimiques, capables de fournir l'énergie nécessaire à cette activité, peuvent exister également au sein du cytoplasme. Nos résultats indiquent seulement que la mobilité leucocytaire aboutissant à l'englobement des germes tire, au moins en partie, son énergie du métabolisme glucidique. Les recherches poursuivies par R. Wagner [45, 46] montrent que ce métabolisme comporte des réactions diastatiques analogues à celles rencontrées dans le foie et le muscle. Il semble donc possible d'admettre que le cytoplasme, qu'il appartienne à des cellules mobiles, comme les leucocytes, ou hautement différenciées comme celles des fibres musculaires, met en jeu les mêmes réactions chimiques, comme sources de l'énergie nécessaire à l'activité physiologique caractéristique de ces cellules.

RÉSUMÉ.

Nos expériences confirment nos précédents résultats en ce qui concerne :

1° Les variations individuelles du taux du glycogène intracellulaire dans les leucocytes inflammatoires de cobaye ;

2° La stabilité du glycogène intraleucocytaire dans des cellules inflammatoires conservées en milieu sérique stérile.

Le dosage du glycogène des polynucléaires, avant et après phagocytose *in vitro*, montre que :

1° Le glycogène intraleucocytaire diminue au cours de la phagocytose de germes variés ;

2° Cette consommation de glycogène est d'autant plus élevée que la phagocytose est plus intense.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. AVICE et S. BAZIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1953 (sous presse).
- [2] A. DELAUNAY. *Ces Annales*, 1944, **70**, 372.
- [3] A. DELAUNAY. *Rev. Immunol.*, 1943, **8**, 96.
- [4] P. EHRLICH. *Die Anämie*. Nathnagels Handbuch, 1898, 8.
- [5] W. FLEISCHMANN. *Biochem. Zeitschr.*, 1927, **184**, 385.
- [6] R. P. GIBB et R. E. STOWEL. *Blood*, 1949, **4**, 569.
- [7] J. DE HAAN. *Biochem. Zeitschr.*, 1921, **128**, 124.
- [8] E. PFLÜGER. *Pflüger's Arch.*, 1903, **96**, 1.
- [9] R. ROBINEAUX, S. BAZIN et A. DELAUNAY. *C. R. III^e Congrès Soc. Int. Europ. Hématol.*, Rome, 1951, p. 123.
- [10] P. SALMON. *Thèse doctorat Médecine*, Paris, 1899.
- [11] M. SOMOGYI. *J. biol. Chem.*, 1937, **117**, 77.
- [12] M. WACHSTEIN. *Blood*, 1949, **4**, 54.
- [13] R. WAGNER. *Arch. Biochem.*, 1946, **11**, 249.
- [14] R. WAGNER. *Blood*, 1947, **2**, 235.
- [15] R. WAGNER. *Arch. Biochem.*, 1950, **26**, 123 et **29**, 260.
- [16] R. WAGNER et A. JOURKE. *Arch. Biochem.*, 1952, **39**, 74.
- [17] R. WILLSTATTER et M. ROHDEWALD. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1931, **203**, 189 ; 1937, **247**, 127.

LES HÉMAGGLUTINOGENES ET LES HÉMAGGLUTININES DU SANG DES REPTILES

II. — MISE EN ÉVIDENCE SUR LES GLOBULES ROUGES DE CERTAINS ANIMAUX DE NOUVEAUX ANTIGÈNES HÉTÉROPHILES A L'AIDE DU SÉRUM DE *VIPERA ASPIS*

par A. EYQUEM et J. FINE (*).

(Institut Pasteur,
Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins.
Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

Nous avons signalé dans une communication précédente [1] que le sérum de *Vipera aspis* possédait des hétéro-agglutinines actives vis-à-vis des globules de chevaux, de mulets, d'ânes et vis-à-vis des globules rouges de certains bœufs.

Poursuivant nos études, nous avons tenté d'individualiser les agglutinogènes responsables de cette agglutination, d'examiner leur communauté antigénique ou, au contraire, leur étroite spécificité.

Dans ce but, nous avons réalisé des absorptions systématiques de sérum de vipère pour obtenir des fractions absorbées par des globules rouges de Jument, de Mulet, d'Ane, ou de Bœufs de la catégorie agglutinable. Nous avons ensuite étudié la présence ou l'absence des hétéro-agglutinines dans chaque fraction absorbée en recherchant l'agglutination ou la non-agglutination des globules rouges de 17 juments (JM₁, JM₂, JM₃..., JM₁₇), des globules rouges de 17 mulets (1 B, 2 B..., 17 B), nés respectivement des juments et indiqués par les numéros correspondants à ceux de leur mère (1 B né de JM₁, 2 B né de JM₂), des globules rouges de 10 ânes, dont 7 sont les pères présumés muletons, enfin des globules rouges de 8 bovidés dont 2 possédaient des érythrocytes non agglutinés par le sérum de vipère.

Nous avons utilisé les globules rouges de 17 juments, 17 mulets, 10 ânes dont les agglutinogènes globulaires A, B, C, D, E, F, G avaient été déterminés suivant la nomenclature définie par l'un de nous avec M^{me} Podliachouk [2, 3, 4].

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1953.

Les résultats sérologiques des agglutinations par les sérums absorbés, de même que les groupes sanguins des globules ayant servi aux absorptions et aux tests, sont rapportés dans les tableaux I, II et III.

TABLEAU I. — Action des fractions absorbées de sérum de *Vipera aspis* sur les globules rouges de juments.

[illegible]

TABLEAU II. — Action des fractions absorbées de sérum de *Vipera aspis* sur les globules rouges de mulets.

[illegible]

TABLEAU III. — Action des fractions absorbées de sérum de *Vipera aspis* sur les globules rouges d'ânes et de bœufs.

	G.R. ÂNES								G.R. BŒUFS									
	VER.	ETH.	RAO.	â1.	â2.	â3.	â4.	â5.	9	19.	35.	3	4	21.	I	10.		
Sérum vipera aspis non absorbé	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	
Sérum vipera aspis absorbé par JMS JM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mulet 2B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ane Eth.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ane VER.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bœuf 9	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
35	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

ANTIGÈNES HÉTÉROPHILES ET HÉTÉRO-AGGLUTININES CORRESPONDANTES.

Les différentes investigations exposées nous ont permis d'établir :

1° La présence d'un antigène hétérophile dénommé BAG, commun aux globules rouges de Jument, de Mulet, d'Ane et de bœufs de la catégorie agglutinable, décelable par le sérum de vipère ;

2° La présence d'un antigène hétérophile VE, commun aux globules de juments, de mulets et de certains ânes, permettant de séparer les ânes en deux groupes : ceux porteurs de l'antigène BAG et ceux porteurs des antigènes BAG et VE ;

3° La présence d'un troisième antigène H, commun à la Jument et au Mulet, antigène qui paraît être indépendant des antigènes A, B, C, D, E, F, G déjà connus chez le Cheval et le Mulet ;

4° Enfin l'antigène A commun au Cheval et au Mulet.

La présence de ces antigènes a été révélée grâce aux hétéro-agglutinines correspondantes présentes dans le sérum de *Vipera aspis* et qui peuvent être divisées en :

Hétéro-agglutinine anti-BAG ;

Hétéro-agglutinine anti-VE ;

Hétéro-agglutinine anti-H ;

Hétéro-agglutinine anti-A équin.

La mise en évidence de l'hétéro-agglutinine anti-A cheval dans

le sérum de *Vipera aspis* a été réalisée de la façon suivante (voir tableaux IV et V).

TABLEAUX IV et V. — Mise en évidence dans le sérum de *Vipera aspis* de l'hétéro-agglutinine décelant l'antigène A du cheval.

J.M.	GLOBULES ROUGES DE JUMENTS MULASSIERES TESTES																
	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Groupe sanguin	C D C	A C F G	A C D F	C G	A E F G	C D	V	C D	F C	P G	C C	D G	C F	A C F	C G	C G	C D F
Sérum de <i>Vipera aspis</i> non absorbé	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sérum absorbé par G.R. de JMI CDG	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
JM4 CG	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
2B AFGB	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3B ADF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4B CB	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
5B E	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-

TABLEAU V.

	G.R. de MULETS																
	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	14B	15B	16B	17B
	C D B	A F G E	A D F	C B	E	C B	B	C D	G B	G F E	C G B	G B	B	A C	C B	C B	C D B
Sérum vipera aspis non absorbé	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sérum absorbé par JMI CDG		+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
JM4 CG		+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
2B AFGB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3B ADF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4B CB		+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	-
5B E		+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	-

Des fractions de sérum de *Vipera aspis* ont été absorbées par des globules rouges de juments appartenant aux groupes CDG,

CG, ACD et FG, des globules rouges de mulets appartenant aux groupes AFGB, ADF, CB et E, chaque fraction absorbée étant examinée vis-à-vis des globules rouges des 17 juments, 17 mulets, 10 ânes de groupes connus. Les globules rouges porteurs de l'agglutinogène A équin sont encore agglutinés par les fractions de sérum absorbé par des globules rouges de juments ou de mulets dépourvus de l'agglutinogène A, alors qu'ils ne sont plus agglutinés par les fractions de sérums absorbés à l'aide de globules rouges porteurs de l'agglutinogène A.

INDÉPENDANCE ENTRE CES HÉTÉRO-AGGLUTININES
ET CELLES DÉCELANT
LES ANTIGÈNES ÉRYTHROCYTAIRES HUMAINS A ET B.

Les hétéro-agglutinines dont nous venons de parler sont différentes des hétéro-agglutinines décelant les antigènes érythrocytaires humains A et B, et différentes des agglutinines hétérospécifiques anti-Homme.

En effet, les fractions de sérum de *Vipera aspis*, absorbé par les globules de différentes juments, ou de mulets, possédant les antigènes A, B, C, D, E, F, G, BAG, VE, H, ou d'ânes possédant les antigènes B, BAG et VE, de bœufs possédant les antigènes BAG, conservent leur pouvoir agglutinant pour les globules rouges O Rh-positifs, O Rh-négatifs, A et B (tableau VI).

TABLEAU VI. — Indépendance des hétéro-agglutinines étudiées et de celles décelant les antigènes érythrocytaires humains A et B.

Testés vis-à-vis de G.R.	Sérum de vipera aspis absorbé par les globules rouges de														
	Sérum vipère non absorbé	Juments				Mulets		Ânes			Bœufs				
		JM 3	JM 4	JM 4	JM 4	2B	5B	VER	Eth.	3	4	9	19	21	55
A ₁	+ + +	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
B	+ + +	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
O Rh	+ +	++	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+++	+++	++	++
O Rh -	+ +	++	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++

Ceci permet d'exclure toute parenté antigénique décelable à l'aide du sérum de vipère entre les agglutinogènes humains A, B et O, et, d'une part, les agglutinogènes A, C, D, E, F, G des chevaux et mulets, B des mulets et des ânes, d'autre part, les agglutinogènes hétérophiles BAG, VE et H précédemment décrits.

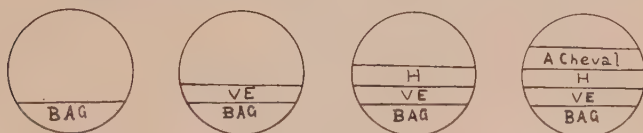
Inversement, le sérum de vipère, absorbé par des globules

rouges A, B ou O garde son pouvoir agglutinant vis-à-vis de tous les globules sur lesquels il était actif avant cette absorption [1].

Il y a donc indépendance des hétéro-agglutinines anti-A et anti-B des sérums de *Vipera aspis*, et des hétéro-agglutinines précédemment décrites.

On peut ainsi, grâce aux hétéro-agglutinines du sérum de *Vipera aspis* décelant les antigènes hétérophiles décrits plus haut,

Globules rouges de juments mulassières et de mulets.



Globules rouges d'ânes.



Globules rouges de bœufs agglutinables.



FIG. 1. — Antigènes hétérophiles décelés sur les globules rouges de juments mulassières, mulets, ânes et bœufs, à l'aide de sérum de *Vipera aspis*.

concevoir leur répartition diverse à la surface des différents globules de ces animaux, comme le montre la fig. 1.

CONCLUSION.

L'étude des hétéro-agglutinines du sérum de *Vipera aspis* nous a permis d'individualiser des facteurs antigéniques communs aux globules rouges de Jument, Mulet, Ane et Bœuf, et de ce fait d'identifier les hétéro-agglutinines correspondantes ainsi que leurs relations avec les hétéro-agglutinines découvertes précédemment. Une étude en cours nous permettra d'entrevoir quelles sont leurs relations avec d'autres espèces zoologiques.

Les sangs des animaux ont pu être obtenus grâce à l'amabilité de nos collègues les docteurs vétérinaires A. Nicol, Girard, Corvazier, Cheyroux, de l'annexe de l'Institut Pasteur à Garches.

Le sang des juments et des muletons a été prélevé par le docteur vétérinaire Millot, grâce à l'amabilité du D^r Saint-Martin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. FINE et A. EYQUEM. Ces *Annales*, 1953, **85**, 328.
- [2] A. EYQUEM et L. PODLIACHOUK. Ces *Annales*, 1952, **83**, 57.
- [3] L. PODLIACHOUK et A. EYQUEM. Ces *Annales*, 1952, **83**, 405.
- [4] L. PODLIACHOUK et A. EYQUEM. Ces *Annales*, 1953, **84**, 966.

RECHERCHES SUR LA NUTRITION DES DERMATOPHYTES

III. — L'HISTIDINE, FACTEUR DE CROISSANCE DES *TRICHOPHYTON* DU GROUPE *ROSACEUM*

par E. DROUHET (*).

(Institut Pasteur,
Service de Mycologie et de Physiologie végétale.)

Dans des publications précédentes sur la nutrition des dermatophytes [1, 2], nous avons signalé que *Trichophyton rosaceum* Sabouraud et *Trichophyton vinosum* Sabouraud exigent l'histidine pour leur croissance dans un milieu synthétique. Georg [3], Silva et Benham [4] l'ont également montré pour d'autres souches de *T. rosaceum* (= *T. megnini*). Au cours de ce travail nous apportons quelques données sur l'action de l'histidine comme facteur de croissance pour quelques souches de dermatophytes et sur l'utilisation de dipeptides contenant de l'histidine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

SOUCHES. — Les souches étudiées sont les suivantes :

- 1° *Trichophyton rosaceum*, souche I. P. 158 ;
- 2° *T. vinosum*, souche I. P. 163 ;
- 3° *T. rosaceum*, souche Gaillard ;
- 4° *T. rosaceum*, souche Westerdijk (I. P. 151) ;
- 5° *Trichophyton* sp., souche Leendert A.

Les deux premières souches proviennent de la collection de l'Institut Pasteur, où elles sont entretenues depuis 1925. Les trois autres proviennent du laboratoire du Dr Rivalier (1), à l'Hôpital Saint-Louis. La souche Leendert A de type *rosaceum* a été isolée d'une épidermophytie généralisée en 1950.

Ces dermatophytes sont entretenus sur les milieux de Sabouraud et sur le moût de bière.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1953.

(1) Nous remercions vivement M. le Dr Rivalier, chef de laboratoire à l'hôpital Saint-Louis, pour son extrême obligeance.

Les souches *T. rosaceum* I. P. 158 et *T. vinosum* I. P. 163 ont conservé les mêmes caractères que ceux décrits par Sabouraud ; à cause de leur ressemblance, cet auteur avait rapproché ces deux espèces. *T. rosaceum* se développe sur les milieux sucrés de Sabouraud sous forme d'une culture veloutée, parfois duveteuse, blanche au début, devenant rose pâle en vieillissant alors que le revers prend une couleur groseille. Les cultures âgées se plissent en vallonements rayonnés. Morphologiquement, *T. vinosum* ne diffère de *T. rosaceum* que par la couleur plus intense du pigment rouge vineux et par un développement plus rapide et plus important. L'intensité de la pigmentation varie suivant les souches de *T. rosaceum* et le milieu de culture ; la coloration la plus intense est obtenue avec la souche I. P. 151 et sur moût de bière ; ce milieu est le plus favorable à la production de conidies.

MILIEUX DE CULTURE. — Le milieu de base utilisé est le suivant : glucose, 10 g ; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g ; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,55 g ; PO_4HNa_2 , 1,66 g ; KCl, 2 g ; solution d'oligo-éléments de Berthelot, X gouttes ; eau distillée, 1 000 cm^3 . La source d'azote est, soit l'asparagine à 1 p. 1 000, soit le sulfate d'ammonium à 1 p. 1 000. Pour les milieux solides on ajoute 18 p. 1 000 de gélose lavée à l'eau puis à l'alcool et les cultures se font dans des boîtes de Legroux contenant 20 cm^3 de milieu. Les cultures en milieu liquide sont effectuées dans des fioles Erlenmeyer de 150 cm^3 contenant également 20 cm^3 de milieu. Certaines fioles de milieu liquide sont maintenues stables, d'autres sont agitées à 95 ± 5 secousses par minute. La température d'incubation pour toutes les cultures est de 23°.

INOCULUM. — La culture mère sur milieu gélosé est fractionnée en petits fragments d'environ 2×2 mm. Ceux-ci sont déposés sur le milieu gélosé (en 2 points éloignés) ou à la surface des milieux liquides stables (un seul fragment par Erlenmeyer). Une suspension de spores sert à l'ensemencement des milieux liquides agités.

EVALUATION DE LA CROISSANCE. — Pour les milieux solides, la croissance a été évaluée par la mesure, à intervalles réguliers, de l'accroissement du diamètre des cultures et, dans certains cas, par poids secs des colonies débarrassées de gélose. Pour les milieux liquides, le poids sec des colonies a servi à mesurer la croissance.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS. — Les souches de dermatophytes étudiées ne se développent qu'en présence d'histidine qui ne peut

être remplacée par aucun autre acide aminé (2) ou mélange d'acides aminés, ni par l'histamine.

I. — ACTION DE L'HISTIDINE.

1° MILIEU SOLIDE. — Afin d'étudier la croissance de ces champignons en fonction de la concentration en histidine, nous avons ajouté les quantités suivantes d'histidine : 0,5, 1, 2, 4, 8, 10, 20, 50, 100, 1 000, 5 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de milieu de base seul ou additionné d'asparagine (1 p. 1 000) ou de sulfate d'ammonium

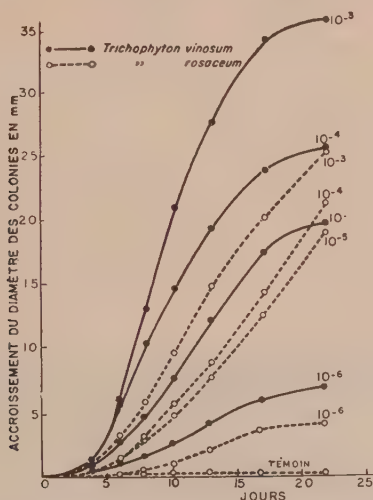


FIG. 1. — Courbes de croissance en fonction du temps de *Trichophyton rosaceum* IP 158 et *T. vinosum* IP 163, pour différentes concentrations d'histidine (milieu de base gélosé renfermant 1 p. 1 000 d'asparagine).

(1 p. 1 000). La quantité minima d'histidine pour provoquer un début de développement varie entre 1 et 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de milieu suivant les souches et le milieu. Le diamètre des cultures augmente avec la concentration en histidine (fig. 1 et 2). Pour une même concentration d'histidine le développement le plus rapide et le plus important est obtenu en présence d'asparagine. Lorsque l'histidine est la seule source d'azote, des concentrations supérieures à 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ sont nécessaires pour obtenir un dévelop-

(2) Au début des expériences un échantillon de lysine avait une faible action sur la croissance de ces dermatophytes ; par analyse chromatographique on a trouvé qu'il contenait une faible quantité d'histidine responsable de la croissance.

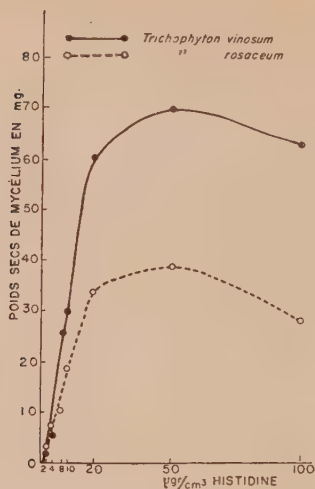


FIG. 2. — Courbes de croissance en fonction de la concentration d'histidine de *T. rosaceum* IP 158 et *T. vinosum* IP 163 après trente jours de culture (milieu de base liquide renfermant 1 p. 1 000 d'asparagine).



FIG. 3. — Aspect des cultures de *T. rosaceum* et *T. vinosum* après un mois de culture sur le milieu de base à l'asparagine en fonction de différentes concentrations d'histidine.

pement caractéristique en surface de ces dermatophytes. Les concentrations inhibitrices d'histidine varient suivant les souches et le milieu. Pour le milieu à base d'asparagine, elles sont supérieures en général à 1.10^{-3} . Après un mois de culture, les poids secs du mycélium permettent de constater une autolyse des cultures, surtout pour des concentrations d'histidine supérieures à 1.10^{-4} .

TABLEAU 1. — Croissance de *T. rosaceum* IP 158 et *T. vinosum* IP 163 en fonction de la concentration d'histidine.

T. vinosum (23 jours de culture)	Concentrations d'histidine	0	1.10^{-6}	1.10^{-5}	5.10^{-5}	1.10^{-4}	5.10^{-4}	1.10^{-3}	5.10^{-3}
	milieu de base gélosé	0	2	3	7	14	23,3	57	82,9
	milieu de base + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 1°/∞	0	6,4	12,4	14	23	35	58,7	91
	milieu de base + asparagine 1°/∞	0	6,9	20	45,7	46,3	55	70	94,7
T. rosaceum (30 jours de culture)	milieu de base gélosé	0	0	2,6	8,4	10	21,1	48,3	30,3
	milieu de base + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 1°/∞	0	3	8,4	16,3	19,3	44	55,3	40
	milieu de base + asparagine 1°/∞	0	8	36,4	41	49	60,7	66,3	46,1
	Les chiffres représentent la moyenne des poids secs exprimés en mgr. du mycélium de deux cultures.								

Il existe des différences de croissance entre les souches étudiées. Le développement de *T. vinosum* est le plus grand et le plus rapide. Sur le milieu à base d'asparagine, une quantité d'histidine de 8 à $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ est nécessaire pour faire apparaître, après trois semaines de culture, la pigmentation de ces dermatophytes. L'intensité de la pigmentation varie suivant les souches : *T. vinosum* > *T. rosaceum* I. P. 151 > *T. rosaceum* I. P. 158 > *Trichophyton*, souche Leendert A.

Les milieux solides offrent l'avantage d'un aspect morphologique plus riche et plus facile à étudier que les milieux liquides. Les microconidies se forment dans les cultures en présence d'histidine, toutefois leur nombre n'atteint pas celui obtenu sur le moût de bière où l'on observe quelques macroconidies. Le facteur favorisant l'apparition de macro- et microconidies reste à déterminer.

2° MILIEU LIQUIDE. — a) *Milieu agité*. — Dans les fioles agitées, le mycélium peut former des petites billes de dimensions inégales ou se rassembler à la périphérie du vase, en grimpant le long des parois. Ces deux faits faussent souvent les mesures pondérales. Pour une étude correcte en milieu agité, il faut un inoculum

constitué par une suspension homogène de spores, difficile à obtenir. Nous avons donc préféré recourir aux milieux stables.

b) *Milieu stable*. — Les cultures en milieu liquide stable paraissent jusqu'à présent la meilleure méthode pour l'évaluation pondérale de la croissance des dermatophytes. Les poids secs obtenus en fonction de concentrations variables d'histidine d'une part, et du temps d'autre part, concordent avec ceux obtenus sur des milieux gélosés. La concentration minimum d'histidine se situe entre 1 et 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; la concentration optimum est entre 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ et le coefficient économique varie suivant les souches et le milieu employé. Ainsi, pour la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ d'histidine dans le milieu de base contenant 1 p. 1 000 d'asparagine, et après trente jours de culture, 1 μg d'histidine permet la formation de 275 μg de mycélium sec avec la souche Leendert A, 150 μg avec les souches I. P. 151 et I. P. 163, et 90 μg avec la souche I. P. 158. En admettant que toute l'histidine soit consommée, le rapport du poids d'histidine au poids de mycélium sec serait respectivement de 1/250, 1/150, 1/150 et 1/90.

II. — ACTION DE DIPEPTIDES A BASE D'HISTIDINE.

L'action des peptides sur la croissance des dermatophytes est peu connue. Or elle semble d'autant plus intéressante à étudier que le meilleur développement des dermatophytes est obtenu sur les milieux complexes à base de peptone et de moût de bière qui contiennent des acides aminés liés sous formes de peptides. Divers auteurs [6, 7] ont montré que certains peptides peuvent remplacer pour la culture des bactéries les acides aminés exigés comme facteurs de croissance. Chez un mutant de *E. coli* exigeant la proline, un peptide à base de proline possède une activité plus grande que la proline libre [7].

Cela nous a incité à comparer l'action de la carnosine (β -alanyl-histidine) et de l'histidyl-histidine à concentrations équimoléculaires d'histidine. L'étude faite en milieu gélosé et en milieu liquide stable est résumée dans le tableau II.

La carnosine et l'histidyl-histidine peuvent remplacer l'histidine comme facteur de croissance. L'activité de la carnosine est presque égale à celle de l'histidine libre, tandis que l'histidyl-histidine est beaucoup moins active. En milieu gélosé les cultures obtenues avec ce dernier produit ont une épaisseur extrêmement faible et un développement en profondeur. La mesure du diamètre des colonies ne permet pas dans ce cas une bonne évaluation du développement mycélien. Les mesures pondérales en milieu liquide permettent de mieux apprécier les différences de croissance des champignons. La faible activité de ce dipeptide constitué uniquement d'histidine pourrait s'expliquer par une hydrolyse défectueuse du produit.

TABLEAU II. — Croissance de deux souches de *T. rosaceum* en fonction de diverses concentrations d'histidine, de β -alanyl-histidine et d'histidyl-histidine.

		substances expérimentées	0	1µg	2µg	4µg	8µg	10µg	50µg	100µg		
		d'histidine liée ou libre par cm ² de milieu.										
Milieu gélosé	Accroissement du diamètre moyen des cultures en mm. après 26 jours de culture	souche IP 151	histidine	0	1	3	7	8	10	15	15	
		β alanyl- histidine	0	0,5	1	3	5	6	15	15		
		histidyl- histidine	0	1*	2*	3*	5*	6*	7*	14*		
		souche Leendert A	histidine	0	0	2	7	12	14	16	18	
		β alanyl- histidine	0	0	2	5	6	7	13	12		
		histidyl- histidine	0	0	1*	6*	8*	10*	12*	14*		
(* cultures d'une faible épaisseur)												
Milieu liquide	Poids sec en mg après 30 jours de culture	souche IP 151	histidine	0,4	2	6	15,8	27,3	30,1	33,4	40,8	
		β alanyl- histidine	0,4	0,81	3	5,6	8	15	45,5	44		
		souche Leendert A	histidine	0,4	0,5	5	10,8	41,1	55	71,6	81	
		histidyl- histidine	0,4	0,5	0,8	3,3	8,7	24	30	34		

La carnosine et l'histidyl-histidine peuvent être utilisées non seulement comme facteurs de croissance pour ces dermatophytes, mais également comme unique source d'azote. Les rendements obtenus pour une quantité d'azote de 0,271 g/l (correspondant à 1 g/l d'histidine) sont semblables à ceux obtenus avec l'histidine libre. Le mélange alanine + histidine donne un meilleur rendement que la carnosine. La carnosine, l'histidyl-histidine, ainsi que l'histidine ne peuvent servir comme unique source de carbone.

DISCUSSION.

Parmi les nombreuses espèces de dermatophytes, étudiées en ce qui concerne les besoins en acides aminés, seules les souches appartenant à l'espèce *T. rosaceum* (*T. megnini*) exigent l'histidine comme facteur de croissance. Cette déficience se rencontre non seulement chez des vieilles souches de collection, mais également chez des souches récemment isolées. Elle peut constituer un critère de différenciation systématique ajouté aux caractères morphologiques. Ainsi ce critère a permis à Georg [3] et à Silva

et Benham [4] de trancher le problème de la différenciation entre *T. rosaceum* (*T. megnini*) et *T. gallinæ*.

T. vinosum avait été classé provisoirement par Sabouraud [5] comme espèce proche de *T. rosaceum*, ne différant de celui-ci que par un pigment rouge vineux, une croissance plus rapide et un aspect duveteux. Le fait qu'on lui trouve le même besoin en histidine que les souches de *T. rosaceum*, qui d'ailleurs présentent des variations d'intensité de pigmentation et de vitesse de croissance, nous fait considérer *T. vinosum* comme une variété de *T. rosaceum*.

Les souches de *T. rosaceum* peuvent se prêter à un dosage de l'histidine. Toutefois plusieurs inconvénients (surtout le temps long du développement) se heurtent à son emploi pratique. La mesure de l'accroissement du diamètre des cultures en milieu gélosé peut servir à évaluer la croissance des champignons. Les résultats sont comparables à la mesure du poids sec des cultures quand la croissance est bonne et quand le mycélium se développe à la surface; tel est le cas des milieux contenant l'asparagine comme source d'azote (aux diverses concentrations d'histidine). Quand la croissance est médiocre, le développement se fait en profondeur comme dans le cas du milieu contenant l'histidine comme seule source d'azote (surtout aux faibles concentrations); dans ce cas l'évaluation du diamètre des cultures n'est plus en concordance avec les mesures pondérales. La meilleure méthode pour l'appréciation de la croissance des dermatophytes reste la méthode pondérale s'appliquant à des cultures en milieu liquide non agité.

CONCLUSION.

1° Cinq souches de dermatophytes du genre *Trichophyton* du groupe *rosaceum* ont été étudiées en ce qui concerne leur besoin en histidine. *T. vinosum* peut être identifié à *T. rosaceum*.

2° L'histidine est le seul facteur de croissance de ces dermatophytes.

3° La concentration minimum d'histidine se situe entre 1 et 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$; la concentration optimum varie entre 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ et une inhibition partielle s'observe à des concentrations supérieures à 1 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

4° La carnosine (β -alanyl-histidine) et l'histidyl-histidine peuvent remplacer l'histidine comme facteur de croissance. L'activité du premier dipeptide est voisine de celle de l'histidine, tandis que l'histidyl-histidine est beaucoup moins active.

5° La carnosine et l'histidyl-histidine peuvent être également utilisées comme seule source d'azote, tandis que, ainsi que pour l'histidine, elles ne peuvent pas servir comme unique source de carbone.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. DROUHET et F. MARIAT. *Ces Annales*, 1952, **82**, 337.
- [2] E. DROUHET. *Ces Annales*, 1952, **82**, 348.
- [3] L. K. GEORG. *Mycologia*, 1952, **44**, 470.
- [4] M. SILVA et R. BENHAM. *J. Invest. Dermat.*, 1952, **18**, 453.
- [5] R. SABOURAUD. *Les Teignes*, Masson édit. Paris, 1910.
- [6] V. NURMIKKO et A. I. VIRTANEN. *Acta chem. Scand.*, 1951, **5**, 97.
- [7] S. SIMMOND et J. FRUTON. *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 705.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 1^{er} Octobre 1953.

Présidence de M. GASTINEL.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter le livre de notre collègue J. Dumas sur *Les animaux de laboratoire* (*).

Cet ouvrage, auquel l'auteur a consacré des années de travail, est beaucoup plus qu'une simple monographie : c'est un véritable traité où l'on trouve décrites à propos de chacun des animaux de laboratoire, les notions d'anatomie et de physiologie indispensables aux expérimentateurs, les techniques d'expérimentation, d'élevage et d'entretien des animaux d'expérience.

La connaissance des maladies bactériennes ou à virus qui frappent les animaux de laboratoire est en effet essentielle, non seulement au maintien en bonne santé du stock des animaux en expérience, mais surtout à la reconnaissance en temps utile des causes d'erreurs qui peuvent gravement affecter les résultats expérimentaux. Le livre de J. Dumas, depuis longtemps attendu, répond pleinement au but qu'il s'est tracé et à l'attente des lecteurs.

Après avoir étudié successivement les généralités sur les animaux de laboratoire, les installations des animaux et les maladies des animaux de laboratoire, qui constituent la partie la plus importante du volume, on trouve dans une quatrième et dernière partie les chapitres consacrés à l'expérimentation sur les animaux : anesthésie, modes d'inoculation, autopsie, destruction des cadavres, etc. C'est assez dire à quel point ce livre constitue d'ores et déjà un manuel essentiel pour les travailleurs de laboratoire. Tout expérimentateur devra s'y référer constamment et y trouvera, dans la mine inépuisable des renseignements qu'il contient, la solution de bien des problèmes que l'utilisation des animaux de laboratoire pose chaque jour.

La présentation impeccable du volume, son agréable typographie et les illustrations nombreuses qu'il renferme, font regretter quelques erreurs typographiques (par exemple la figure 23 est la photographie d'un babouin et non d'un chimpanzé) qu'il est souhaitable de voir corriger dans une édition ultérieure.

(*) J. Dumas. *Les animaux de laboratoire*. Editions Médicales Flammarion, 22, rue de Vaugirard, Paris-6^e, 1953, 719 pages.

COMMUNICATIONS

**ESSAIS DE TRAITEMENT
DE LA MYXOMATOSE DES LAPINS
PAR QUELQUES ANTIBIOTIQUES**

par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT.

(Aidé-Technique : A. LE PRIOL.)

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale.)

L'agent de la myxomatose des lapins est un ultravirus d'assez grandes dimensions, 175 m μ environ, et l'on pouvait se demander si, comme d'autres virus présentant cette caractéristique, il ne serait pas justiciable de l'antibiothérapie. La terminaison normale de la myxomatose étant la mort, en obtenir la guérison, ne fût-ce que dans une faible proportion des cas, présenterait un réel intérêt, sur le plan doctrinal au moins.

Nous rapporterons succinctement ici les essais que nous avons effectués depuis que la myxomatose s'est implantée en France.

I. — Le lapin 153 a été mis en cohabitation avec un malade. Le 5 novembre 1952 il a le facies grippé. On commence le traitement : injections biquotidiennes d'auréomycine par voie veineuse, à raison de 3 mg chaque fois. La maladie suit un cours normal et l'animal meurt dans la forme classique le 9 (cinquième jour du traitement).

Les lapins 549 et 403 sont inoculés de myxomatose le 18 août 1953, chacun recevant sous la peau du front 0,5 cm³ d'une suspension de suc d'œdème ano-génital prélevé sur un malade. A partir du lendemain 19 et pendant trois jours, chacun d'eux recevra trois fois par jour, dans la veine auriculaire, 3 mg d'auréomycine d'un côté et 4 cm³ de sérum antimyxomateux de l'autre. Le lapin 403 meurt de myxomatose le 27 ; le lapin 549 fait une maladie d'intensité faible et guérit ; indépendamment de la lésion frontale qui a atteint la grosseur d'une noix et a été éliminée en trois semaines, cet animal a présenté quelques nodules aux oreilles et à un membre postérieur. Son état général est resté satisfaisant.

Un lapin témoin est mort le 30 août.

Les lapins 881 et 882 sont inoculés le 31 août 1953, chacun recevant sous la peau du front 1 cm³ d'une suspension au 1/1 000 de substance de myxome, quantité dosée et ne représentant que quelques unités de virus. Le lendemain on commence le traitement comportant emploi d'auréomycine et d'antisérum selon le même protocole que précédemment et cela pendant quatre jours. Ces animaux meurent de myxomatose les 13 et 11 septembre respectivement ; le témoin meurt le 13.

II. — Les lapins 163 et 164 ont été mis en cohabitation avec des

malades ; ils présentent des signes de myxomatose le 18 novembre 1952 (blépharite unilatérale et un nodule à la cuisse, pour le premier ; blépharite double et des nodules aux pattes et sur l'épaule pour le second). On leur applique chaque jour le traitement suivant : terramycine par voie péritonéale, 100 mg matin et soir ; didromycine par voie musculaire, 60 mg le matin ; sulfadiazine par voie buccale, 60 mg matin et soir. Ce traitement reste sans influence sur le cours de la maladie qui se termine par la mort après quatre jours, chez le premier et trois jours chez le second.

L'autopsie révèle chez le premier un léger degré de néphrite, chez le second un foyer de congestion pulmonaire.

III. — Le lapin 186 a été mis en cohabitation avec un malade ; il présente une légère blépharite le 25 novembre 1952 ; on commence immédiatement le traitement quotidien conformément au protocole suivant : auréomycine par voie veineuse, 3 mg matin et soir ; didromycine par voie musculaire, 60 mg à 14 heures ; pénicilline par voie musculaire, 10 000 U à 14 heures ; sulfadiazine par voie buccale, 60 mg matin et soir. L'animal meurt de myxomatose le 29, cinquième jour de la maladie. L'autopsie révèle un certain degré de congestion hépatique et des foyers de congestion pulmonaire.

IV. — Le lapin 188 a été infecté par inoculation de virus dans l'épaisseur des paupières. Il présente de la blépharite le 25 novembre 1952 ; on lui applique quotidiennement le traitement suivant : terramycine par voie veineuse, 100 mg matin et soir ; didromycine par voie musculaire, 60 mg à 14 heures ; chloromycétine par voie buccale, 25 mg à 14 heures ; sulfadiazine par voie buccale, 60 mg matin et soir. L'animal meurt de myxomatose après sept jours de maladie.

V. — Les lapins 199 et 200 ont été mis en cohabitation avec des malades ; ils présentent l'un, le 5 décembre 1952, l'autre le 6, des signes de myxomatose (blépharite, petits nodules à la cuisse, œdème génital) ; le jour où apparaissent ces troubles on commence un traitement quotidien ainsi constitué : PAS par voie buccale, 5 g ; thiosemicarbazone, par voie buccale, 75 mg, isoniazide de l'acide nicotinique par voie hypodermique, 75 mg.

Ils meurent l'un et l'autre après aggravation des manifestations myxomateuses, le troisième et le deuxième jour du traitement respectivement.

L'un et l'autre présentent un peu d'engouement pulmonaire.

Conclusions. — Le traitement de la myxomatose des lapins par divers antibiotiques associés selon les formules suivantes :

- a) terramycine + dihydrostreptomycine + sulfadiazine ;
- b) auréomycine + dihydrostreptomycine + pénicilline + sulfadiazine ;
- c) terramycine + dihydrostreptomycine + chloromycétine + sulfadiazine ;
- d) PAS + thiosemicarbazone + isoniazide de l'acide nicotinique est resté sans influence apparente sur la marche de la maladie qui dans tous les cas s'est terminée par la mort ; il semble d'ailleurs que ces associations aient présenté quelque toxicité.

Nous avons observé un cas de guérison sans manifestations graves chez un animal traité par l'auroéomycine associée à l'antisérum (lapin 549). Mais comme trois autres lapins semblablement traités sont morts dans des conditions normales, nous inclinons à penser que l'unique survivant offrait à la myxomatose une certaine résistance naturelle. Le fait ne serait pas nouveau puisque, au dire des auteurs qui ont étudié la myxomatose des lapins d'Europe en Amérique et en Australie, parmi les animaux contaminés il s'en rencontre, exceptionnellement ou du moins rarement, qui lui sont réfractaires ou chez lesquels la maladie se termine par la guérison.

Notons enfin que les ensemencements pratiqués à partir des cadavres de ces divers lapins n'ont donné aucune culture microbienne, contrairement à ce que l'on constate si souvent en partant des cadavres d'animaux morts sans traitement.

ÉTUDE DE L'ENLÈVEMENT PAR LES ACIDES AMINÉS DU CUIVRE COMBINÉ AUX PROTÉINES (II)

par FERNAND PASQUIER et MICHEL MACHEBOEUF.

(Institut Pasteur, Paris.)

Dans un mémoire antérieur [1], nous avons montré que des aminoacides, et tout particulièrement le tryptophane, peuvent détacher le cuivre des protéines auxquelles il est combiné.

Nous apportons aujourd'hui des compléments à ce travail, en étudiant l'enlèvement du cuivre des cuproprotéines par certains aminoacides qui n'avaient pas été envisagés jusqu'ici.

Les expériences ont porté sur du sérum normal de cheval dialysé et cuivré à saturation, à pH 8. Ce sérum (2 ml) était placé dans un petit dialyseur, lequel plongeait dans une solution d'acide aminé, amenée également à pH 8 par addition de soude. Dans ces divers essais, on a fait varier certaines conditions expérimentales : la durée de la dialyse, le volume de la solution et la concentration en acide aminé. Les résultats obtenus permettent tous d'établir la même hiérarchie.

A titre d'exemple, nous donnons les résultats pour les conditions expérimentales suivantes : durée de la dialyse contre solution d'acide aminé, trois jours ; durée de la dialyse contre eau bidistillée, une journée ; concentration en acide aminé, M/250 ; volume du liquide extérieur au dialyseur, 100 ml.

Dans ces conditions, c'est-à-dire sans renouvellement du liquide extérieur au dialyseur, le cuivre n'est pas complètement enlevé, même par l'histidine, mais les différences d'activité des divers aminoacides apparaissent nettement.

ACIDE AMINÉ	HISTIDINE	TRYPTOPHANE	OXYPROLINE	PROLINE	TYROSINE	ARGININE
Cuivre dans le dialyseur avant la dialyse. . . .			150 μg			
Après la dialyse. . . .	15 μg	36 μg	38 μg	48 μg	48 μg	60 μg

ACIDE AMINÉ	ARGININE	ALANINE	PHÉNYLALANINE	MÉTHIONINE	GLUTAMATE DE SODIUM
Cuivre dans le dialyseur avant la dialyse. . . .			150 μg		
Après la dialyse. . . .	60 μg	70 μg	78 μg	95 μg	124 μg

Remarque. — En réalité, on utilise non l'histidine, mais le monochlorhydrate d'histidine. Le chlorure de sodium formé par addition de soude (pour porter à pH 8) n'apporte aucune perturbation sensible.

L'examen de ces deux tableaux montre que l'histidine est le plus actif des acides aminés. Dans l'ordre des activités décroissantes, viennent ensuite le tryptophane et l'oxyproline.

En somme, les aminoacides dont l'activité sur les cuproprotéines est la plus grande sont ceux dont les molécules comportent une fonction imine. Ceci confirme l'hypothèse que nous avons émise. Notons en outre qu'un oxydriole phénolique (tyrosine) peut également jouer un certain rôle.

BIBLIOGRAPHIE

[1] F. PASQUIER et M. MACHEBOEUF. *Ces Annales*, 1950, **79**, 121.

UN NOUVEAU TYPE DE *SALMONELLA* : *SAL. GAROLI*

par L. LE MINOR, R. DEVIGNAT et M. SCHOETTER
(avec la collaboration technique de A. REMOND).

(Institut Pasteur, Paris, et Laboratoire de Blukwa [Congo belge].)

En janvier 1953, nous avons isolé des selles d'un indigène congolais, hospitalisé pour troubles intestinaux, une salmonelle dont la formule

ne correspondait à aucun type actuellement décrit. Les selles du malade avaient été adressées, en milieu glyciné tamponné, au laboratoire de Blukwa (Congo belge).

Cette salmonelle, mobile, fermente avec production de gaz : glucose, sorbitol, dulcitol, tréhalose, mannitol, maltose, rhamnose, arabinose et xylose. Elle ne fermente pas après observation de vingt et un jours : lactose, saccharose, adonitol, salicine et inositol.

Elle ne produit pas d'indole, ne liquéfie pas la gélatine, ne produit pas d'acétyl-méthyl-carbinol, n'hydrolyse pas l'urée. Elle réduit les nitrates en nitrites, utilise le citrate de sodium comme seule source carbonée (milieu de Simmons) et fermente le glycérol en milieu de Stern. Elle produit de l'hydrogène sulfuré. La réaction du rouge de méthyle est positive.

La souche est agglutinée sur lame par les sérums anti-VI-VII, VI-VIII, VII saturé et *i*. Après passage sur gélose molle additionnée de sérum anti-*i* (méthode de Gard), elle est agglutinée par les sérums 1,2 1,5 1,6, 1,7 et 6 saturé. Elle ne l'est pas par les sérums anti-2, 5, 7 saturés.

Nous avons injecté à un lapin une culture de dix-huit heures en bouillon, formolée, de la souche en état diphasique (1 milliard, 2 milliards, 4 milliards de germes par voie intraveineuse, à quatre jours d'intervalle. Saignée dix jours après la dernière injection).

Le sérum du lapin agglutine la suspension O de notre souche au titre de 1/3 200, la suspension H phase 1 à 1/25 600 et la suspension H phase 2 à 1/6 400.

D'autre part, *S. typhi murium*, phase 1 (*i*) est agglutinée au titre de 1/25 600 ; *S. newport*, phase 2 (1,2) à 1/800 ; *S. cholerae suis* var. *kunzendorf* (1,5) et *S. london*, phase 2 (1,6) à 1/3 200 ; *S. carrau*, phase 2 (1,7) à 1/400.

Les agglutinines O sont saturées par *S. paratyphi* C. Les antigènes sont donc VI-VII.

Nous avons ensuite saturé les agglutinines H par *S. typhi murium*, phase 1 (*i*). Il ne reste plus d'agglutinines pour la souche en étude phase 1, tandis que celles pour les souches phase 2 sont maintenues.

Une saturation ultérieure par *S. london*, phase 2 (1,6) amena la disparition complète des agglutinines. *S. typhi murium*, phase 1 et *S. london*, phase 2 peuvent donc saturer les agglutinines H.

Inversement, nous avons saturé par notre germe des sérums non spécifiques 1,2 (*S. paratyphi* B, phase 2) ; 1,5 (*S. cholerae suis*, var. *kunzendorf*) ; 1,6 (*S. london*) ; 1,7 (*S. arechevaleta*). Nous avons ensuite titré nos sérums vis-à-vis de ces salmonelles. Seul le sérum 1,6 fut saturé.

Nous pouvons donc conclure que la formule antigénique de notre germe est VI-VII, *i*-1,6.

L'antigène *i* n'avait jusqu'à présent pas été signalé dans le groupe C₁.

Résumé. — Les auteurs décrivent une nouvelle espèce de *Salmonella*, *S. garoli*, dont la formule est VI-VII *i*-1,6. Elle fut isolée par coproculture au Congo belge chez un indigène présentant des troubles intestinaux.

LES TYPES DE SALMONELLES RENCONTRÉS PAR LE CENTRE NATIONAL DES SALMONELLES A CEYLAN

par EKKEHARD E. SCHMID.

(Medical Research Institute, Colombo.)

Plusieurs auteurs ont rapporté depuis 1943 que 97 p. 100 à 99,5 p. 100 des souches de salmonelles rencontrées appartiennent aux groupes A-E du schéma de Kauffmann-White. Le nombre des souches examinées a varié de 1 007 à 12 000 [1 à 4].

Ces rapports ont été la base sur laquelle Kauffmann et Edwards [4] se sont fondés pour recommander une simplification du diagnostic sérologique des salmonelles.

Ces résultats ayant été obtenus dans des climats tempérés, il nous a semblé utile de rapporter les observations faites dans un pays tropical.

Le Centre National des Salmonelles, à Ceylan, a commencé ses recherches en juillet 1950 et les résultats de trois années sont présentés dans le tableau ci-joint.

Sur un total de 47 284 épreuves, 5 656 souches de salmonelles ont été isolées, dont la plus grande partie (5 144 souches, ou 90,95 p. 100) sont membres des groupes A-E du schéma de Kauffmann-White.

Parmi les souches de *S. paratyphi* A une variété nouvelle contenant la fraction XII₂ de l'antigène somatique XII a été isolée pour la première fois [5].

L'association de l'homme avec les animaux est plus intime dans les régions tropicales que dans les climats tempérés et 4 types seulement des salmonelles rencontrées en coproculture des animaux (*S. dublin*, *S. gallinarum pullorum*, *S. wichita*, *S. urbana*) n'ont pas encore été isolés de l'homme à Ceylan [6].

Résumé. — La majeure partie (90, 95 p. 100) des 5 656 souches de salmonelles isolées à Ceylan appartient aux groupes A-E du schéma de Kauffmann-White. La répartition des types isolés de l'homme et des animaux est présentée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. R. EDWARDS et D. W. BRUNER. *J. infect. Dis.*, 1943, **72**, 58.
- [2] E. SELIGMAN, I. SAPHRA et M. WASSERMANN. *J. Immunol.*, 1946, **54**, 69.
- [3] D. W. BRUNER et B. J. JOYCE. *Amer. J. Hyg.*, 1947, **45**, 19.
- [4] F. KAUFFMANN et P. R. EDWARDS. *J. Lab. Clin. Med.*, 1947, **32**, 548.
- [5] E. E. SCHMID et F. KAUFFMANN. *Acta path. Scand.*, 1952, **30**, 7.
- [6] E. E. SCHMID et T. VELAUDAPILLAI. *Veterinary Record*, 1953 (sous presse).

	SANG	FÈCES	ANIMAUX	TOTAL
Nombre d'épreuves . . .	40 764	5 742	778	47 284
<i>S. paratyphi</i> A	993	4		994
<i>S. paratyphi</i> B	2	11	1 (1)	14
<i>S. stanley</i>		20		20
<i>S. saint-paul</i>		6	2 (1)	8
<i>S. san diego</i>	2	11		13
<i>S. typhi murium</i>	2	17	6 (2, 3, 4, 5)	25
<i>S. coeln</i>		4		4
<i>S. oslo</i>		2		2
<i>S. virchow</i>	14	320	2 (1, 6)	336
<i>S. richmond</i>	1	5		6
<i>S. tennessee</i>	2	1		3
<i>S. newport</i>		16	1 (1)	17
<i>S. litchfield</i>		6		6
<i>S. bovis morbificans</i>	1	5		6
<i>S. kentucky</i>	1			1
<i>S. typhi</i>	3 624	19	1 (7)	3 644
<i>S. eastbourne</i>		4		4
<i>S. enteritidis</i>	6	8	3 (7)	17
<i>S. dublin</i>			1 (8)	1
<i>S. javiana</i>		9		9
<i>S. gallinarum pullorum</i>			3 (9)	3
<i>S. butantan</i>		3		3
<i>S. muenster</i>		1		1
<i>S. weltevreden</i>	1	4	4 (7)	9
<i>S. amager</i>		1		1
<i>S. new brunswick</i>		1		1
<i>S. chittagong</i>		1		1
<i>S. senftenberg</i>		1		1
Groupes A-E	4 649	471	24	5 144
<i>S. wichita</i>			1 (10)	1
<i>S. poona</i>		4	3 (1)	7
<i>S. urbana</i>			2 (1)	2
<i>S. aelaide</i>	2	489		491
<i>S. champagne</i>		7		7
<i>S. waycross</i>		4		4
Total	4 651	975	30	5 656

- (1) Isolé de chèvres.
 (2) Isolé de chiens.
 (3) Isolé d'éléphants.
 (4) Isolé de pigeons.
 (5) Isolé de chimpanzés.
 (6) Isolé de bétail.
 (7) Isolé de rats.
 (8) Isolé de porcs.
 (9) Isolé de volaille.
 (10) Isolé de *Bandicota malabarica*.

ERRATUM

Page 505, article « Ultracentrifugation et électrophorèse du sérum et du plasma de poules leucosiques », par Slizewicz et Atanasiu, troisième ligne ; au lieu de : « Les deux derniers mois de la maladie », lire : « Les deux derniers jours de la maladie ».

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Réactions d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée dans la lèpre, par M. VIETTE.

Etude de l'action du BCG sur la formule leucocytaire et la phagocytose dans l'exsudat péritonéal de cobayes inoculés avec des bacilles de Stefansky vivants ou morts, par J. NEYRA-RAMIREZ.

Sur la transmission expérimentale de la brucellose au lapin, par H. JACOTOT, A. VALLÉE et A. LE PRIOL.

Nouvelles recherches sur l'évaluation de l'activité anti-« histolyticum » et anti-« septicum » de divers sérums, par M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY.

Activité antitoxique du sérum des animaux ayant reçu pendant quelques mois des injections de toxine « septicum » ou d'anatoxine « histolyticum », puis des injections simultanées de toxine « septicum » et d'anatoxine « histolyticum », par M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY.

Anticorps bloquant dans le sérum de sujets brucelliques.
IV. Rôle dans le phénomène de zone (deuxième note).
V. Importance pour le diagnostic de la brucellose caprine,
par G. RENOUX.

Etudes sur les « Escherichia coli » isolées au cours des gastro-entérites infantiles. I. Propriétés biochimiques et antigéniques, par M^{me} S. LE MINOR, L. LE MINOR, P. NICOLLE et R. BUTIAUX.

LIVRES REÇUS

Hans Selye et A. Horava. — *Second Annual Report on Stress*. 1 vol. 526 p. Acta Inc., Medical Publishers, édit., Montréal (Canada), 1952. Prix : 10 dollars.

Le nombre toujours croissant de travaux sur ce sujet a amené Selye à décider la publication de volumes annuels qui permettraient de suivre la question. Les faits et les théories sont présentés, autant que possible, séparément, afin que les faits puissent être utilisés par les chercheurs mêmes qui n'admettent pas les interprétations de l'auteur. Après plusieurs pages de planches hors texte illustrant les observations

récentes, viennent une bibliographie de 174 pages, puis un index alphabétique indiquant les différents facteurs de « stress » et les organes ou systèmes sur lesquels ils agissent. Le but que l'auteur se proposait, de faciliter l'orientation des travailleurs désireux de se familiariser avec tout ou partie des problèmes posés par la question, semble donc pleinement atteint.

H. T.

Rosemary Biggs et R. G. MacFarlane. — *Human Blood Coagulation and its Disorders*. 1 vol. 406 p., 57 fig., 36 tabl. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1953. Prix : 32 sh. 6 d.

Le but de ce livre est de présenter l'état actuel de nos connaissances en ce qui concerne la coagulation du sang. La première partie est consacrée au mécanisme — extraordinairement compliqué — de cette coagulation et expose les faits acquis à ce jour sur la question. Elle étudie en outre les différents facteurs de la coagulation, ses accélérateurs, ses inhibiteurs, le fibrinogène, les anticoagulants, etc. ; mais elle comprend aussi le compte rendu des recherches récentes sur la thromboplastine et la « globuline antihémolytique », recherches qui seraient susceptibles de modifier complètement les idées reçues sur l'hémophilie. La seconde partie traite des perturbations de la coagulation et, en particulier, de l'hémophilie et de la thrombocytopenie ; elle envisage également le diagnostic et le traitement de ces perturbations. Un autre chapitre est consacré à la signification de la coagulation du sang, à sa valeur dans l'hémostase (laquelle semble se produire indépendamment de la coagulation), à ses rapports avec différentes autres propriétés du sang (agglutination, hémolyse, complément), et à son rôle dans le métabolisme, la fibrine constituant peut-être une des sources des protéines de l'organisme. Enfin un dernier chapitre concerne la coagulation chez les espèces animales inférieures, et en particulier chez les Insectes, chez lesquels le mécanisme est très différent de ce qu'il est chez les mammifères.

Les différentes techniques sont décrites dans un appendice.

H. T.

G. F. Petrie et C. E. Eckersley. — *British Medical Science and Practice*. 1 vol. 180 p., 7 pl. hors texte. Longmans, Green et C^{ie}, Londres, New-York, Toronto, 1953.

Ce petit livre, destiné à faire connaître la contribution anglaise aux progrès de la médecine, est divisé en deux parties : une partie historique qui présente brièvement, par des extraits de mémoires contemporains ou de biographies, « dix pionniers de la médecine anglaise », depuis Harvey jusqu'à Manson, et une « Anthologie de la médecine britannique moderne », comprenant plusieurs sections : médecine générale, médecine tropicale, physiologie, biochimie, immunologie, infections à virus, génétique, chirurgie, cancérologie, obstétrique, dans laquelle sont donnés de courts extraits des travaux des auteurs anglais qui ont étudié ces différentes questions.

H. T.

TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 85

<i>Acide ribonucléique. Structure l'</i> — I. Fractionnement par l'acide acétique.	64
— II. Modification de la ribonucléase.	230
— III. Faits en faveur de liaisons de type secondaire.	348
— Comportement physico-chimique de l' — — de levure soumis à l'action des hautes pressions.	629
— Voir aussi <i>Streptomycine</i> .	
<i>Acridines. Voir Mutations.</i>	
<i>Actinobacterium meyeri. Appareil nucléaire, antibiogramme et pouvoir pathogène d' — —</i>	258
<i>Alcaloïdes. Action des — sur les bactéries.</i>	757
<i>Anémie hémolytique. — — par hétéro-immunsérum chez le chien.</i>	48
<i>Antibiotiques. — et résistance microbienne.</i>	108
— Technique simplifiée pour l'étude de l'action bactéricide des associations d' —	122
— Action de quelques — sur divers types de <i>B. prodigiosus</i> issus de la même souche.	394
— Emploi du pinacyanol pour l'étude du mode d'action des —	396
— Voir aussi aux différents antibiotiques.	
<i>Anticorps. Transfert à des lapins neufs de la capacité de production d' — par des fragments de rate d'animaux immunisés.</i>	34
<i>Auréomycine. Voir B. tuberculeux.</i>	
<i>B. anthracis. Influence de la concentration en peptone sur la culture et la sporulation de — —</i>	671
<i>B. cereus. Description de quelques souches entomophytes de — —</i>	90
<i>B. prodigiosus. Voir Antibiotiques.</i>	
<i>B. subtilis. Mise en évidence de produits intermédiaires contenant du glucose dans la synthèse des lévanes par — —</i>	356
<i>B. tuberculeux. Sensibilité des souches streptomycino-résistantes de M. tuberculosis vis-à-vis de l'INH.</i>	116
— Nouvelle technique d'inoculation au cobaye de produits surinfectés. Usage de l'auréomycine.	274
— Action des agents tensio-actifs sur le — — : le Tween 80.	277
— Comportement des cobayes tuberculeux traités par l'INH à l'égard de la sensibilisation tuberculinique et des phénomènes de surinfection	287

<i>B. tuberculeux</i> . Croissance du — — en présence de phosphore radioactif	402
— Voir aussi <i>Streptomycine</i> , <i>INH</i> .	
<i>B. de Whitmore</i> . Pouvoir pathogène du — —	99
— L'appareil flagellaire du — —	112
— La réaction d'hémagglutination dans la mélioïdose.	530
<i>Bactérie pyrogène</i> . — — isolée d'une eau distillée.	660
<i>Bactériophage</i> . Rôle du phosphore dans le développement de la résistance du — aux rayons U-V.	1
— Incidence des types biochimiques parmi les types bactériophagiques de <i>S. typhi</i>	185
— Type bactériophagique des staphylocoques pathogènes sécréteurs de pénicillinase.	387
— Les antigènes d' <i>E. coli</i> au cours de la lyse bactériophagique.	470
— Activité bactériostatique du bactériophage staphylococcique H.	483
— Voir aussi <i>Staphylocoque</i> .	
<i>Botulisme</i> . Action de la cortisone sur l'immunisation du lapin par l'anatoxine botulique B.	255
— Nouvelles recherches sur le — et ses cinq types toxiniques.	544
<i>Brucelles</i> . Relations antigéniques entre vibriion cholérique et —	261
<i>Champignons</i> . Intoxication par l'amanite phalloïde. Réactions humorales	139
<i>Cobaye</i> . Le virus « Cobaye E. R. », virus septicémique latent du — à potentiel neurotrope.	724
<i>Cortisone</i> . Voir <i>Botulisme</i> .	
<i>Dermatophytes</i> . La nutrition des —. III.	791
<i>Electrophorèse</i> . Etude par micro — sur papier du sérum de chiens normaux et pathologiques.	508
— Voir aussi <i>Leucose</i> .	
<i>Encéphalomyélite</i> . Isolement d'un virus d'— au cours d'une épidémie de « poliomyélite clinique » à Brazzaville. I.	316
— Virus encéphalomyélitique du singe isolé à Brazzaville d'un <i>Allenopithecus nigroviridis</i>	593
<i>Erythromycine</i> . Voir <i>Ilotycine</i> .	
<i>Facteurs de croissance</i> . Recherche et dosage de quelques — — dans un milieu à base d'hydrolysât de protéines.	664
<i>Fiche réticulo-endothéliale</i> . La — — —. Quelques remarques techniques et paramètres du sérum normal.	281
— La — — —. Relations entre l'électrophorèse et les diagrammes de solubilité	646
<i>Fièvre jaune</i> . Le vaccin contre la — — préparé par l'Institut Pasteur de Dakar.	735
<i>Glycogène</i> . Variations du — intraleucocytaire au cours de la phagocytose	774
<i>Glycolyse</i> . Etude de la — chez certaines bactéries du genre <i>Bacillus</i> . I.	71

<i>Grippe</i> . Variations du pH du liquide allantoïque inoculé de virus grippal	222
<i>Groupe sanguins</i> . L'iso-hémagglutinine anti-T chez différentes espèces animales. I et II.	127 et 527
— Essai d'obtention chez la chèvre, le mouton et le chien d'anticorps décelant les antigènes érythrocytaires humains M et N. . .	268
— Les hémagglutinogènes et les hémagglutinines des sangs de vipères. I. <i>V. aspis</i>	328
— II. Mise en évidence sur les globules rouges de certains animaux d'antigènes hétérophiles à l'aide du sérum de <i>V. aspis</i> . . .	784
— des Equidés. IV. Nouvelles observations sérologiques.	621
<i>Ictère</i> . Culture sur œuf embryonné et identification immunologique du virus de l'— épidémique d'A. E. F.	492
<i>Notycine</i> . L'—, nouvel antibiotique élaboré par <i>Streptomyces erythreus</i>	148
<i>Immunochimie</i> . Analyse immunochimique du sérum humain et de ses fractions. I.	336
<i>INH</i> . Action combinée <i>in vitro</i> de divers tuberculicides avec l'— — Voir aussi <i>B. tuberculeux</i> , <i>Lèpre</i> .	164
<i>Inhibition</i> . Propriétés inhibitrices de différents sucres sur la croissance de certains microorganismes.	408
<i>Insectes</i> . Mise en évidence au microscope électronique du virus de la polyétrie de <i>Plusia gamma</i> L.	170
<i>Lèpre</i> . Evolution de l'infection à b. de Stefansky chez le rat traité par l'INH.	398
— Réactions cellulaires et phagocytose chez les cobayes inoculés avec des b. de Hansen.	713
<i>Leucose</i> . Action des pressions élevées sur le virus de la —.	500
— Ultracentrifugation et électrophorèse du plasma de poules leucosiques	505
— Sensibilité de l'embryon de poulet au virus de la — aviaire. . .	586
<i>Levures</i> . Voir <i>Mutations</i> .	
<i>Mélioïdose</i> . Voir <i>B. de Whitmore</i> .	
<i>Mutations</i> . Rapports entre la structure des acridines et leur activité mutagène.	199
— Influence du pH sur l'action toxique et mutagène de l'euflavine.	443
<i>Myxomatose</i> . Essais infructueux de vaccination contre la — des lapins par anavirus tissulaire	133
— Essais de traitement de la — par quelques antibiotiques. . . .	801
<i>Noyau</i> . Recherches sur la substance nucléaire de <i>Bifidobacterium bifidum</i> et d' <i>Actinobacterium cellulitis</i>	125
<i>Organismes L</i> . Milieu de culture pour l'isolement des — dans les uréthrites amicrobiennes	515
— Transformation en bactéries normales d'— isolés d'uréthrites amicrobiennes	520

TABLE ANALYTIQUE

813

<i>Organismes L.</i> Précisions sur le cycle L des bactéries.	525
<i>Paracolobactrum</i> . Un — possédant l'antigène somatique du type <i>Sh. bodyii</i> 11 et d' <i>E. coli</i> O 105.	496
<i>Paradentose</i> . La flore microbienne de la —.	512
<i>Pénicilline</i> . Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à la — par voie carotidienne.	119
<i>Peste</i> . La phase de latence dans la croissance de <i>P. pestis</i>	372
— Résistance à la — de certains rongeurs sauvages. I.	411
<i>Pinacyanol</i> . Voir <i>Antibiotiques</i> .	
<i>Poliomyélite</i> . Cultures cellulaires et virus de la —.	107
— Les lésions cellulaires du virus de la — en culture <i>in vitro</i>	264
— Culture du virus de la — sur différentes souches cellulaires d'origine humaine	576
— L'épidémie de — de Saint-Augustin (P. Q. Canada). II.	690
— Voir aussi <i>Encéphalomyélite</i> .	
<i>Protéines</i> . Enlèvement par les acides aminés du cuivre combiné aux —.	803
<i>Rage</i> . Apparition de corps de Negri dans les lésions provoquées par le virus fixe sous l'action de la hyaluronidase.	263
— Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1952.	308
<i>Rayons U.-V.</i> Appareil simple pour le dosage des — — émis par les lampes germicides	174
— Voir aussi <i>Bactériophage</i> .	
<i>Réaction de Dubos et Middlebrook</i> . La — — — test cytochimique de la virulence des Mycobactéries	746
<i>Salmonella</i> . Une nouvelle espèce de — isolée chez un corbeau : <i>S. hessarek</i>	271
— Essai de subdivision de quelques lysotypes B Vi de <i>S. para-</i> <i>typhi</i> B.	706
— Un nouveau type de — <i>S. garoli</i>	804
— Les types de — à Ceylan.	806
<i>Sédimentation</i> . La précision des mesures de constante de —.	503
<i>Silico-gel</i> . Préparation d'un — — dialysé stérile.	666
<i>Sol</i> . Titrage du pouvoir ammonifiant de la microflore des —.	82
— La cellulolyse anaérobie du —.	135
— Méthode de dosage du phosphore dans les —.	247
— Action du phosphore sur les germes nitrificateurs et déniti- ficateurs du —.	365
<i>Staphylocoque</i> . Relations entre la résistance à la pénicilline et la sensibilité aux phages chez les —.	390
— Voir <i>Bactériophage</i> , <i>Streptomycine</i> .	
<i>Streptomycine</i> . Mode d'action de la —. III. Cas de <i>M. tuberculosis</i>	295
— IV. Résistance de <i>M. tuberculosis</i>	451
— Diffusion de la — dans les lésions caséuses des tuberculeux pulmonaires.	380

<i>Streptomycine</i> . Un cas de résistance simultanée à la — et au bichlorure de mercure chez un staphylocoque.	383
— Les acides nucléiques des souches bactériennes résistantes et sensibles à la —.	463
<i>Sulfamides</i> . Détermination de la sensibilité aux — par une méthode de disques séchés.	56
<i>Syphilis</i> . Intradermo-réaction aux suspensions de tréponèmes formolées	23
<i>Systématique</i> . Etude comparative des genres <i>Moraxella</i> , <i>Achromobacter</i> et <i>Alcaligenes</i>	675
<i>Tétanos</i> . Les anatoxines tétaniques concentrées.	376
<i>Tumeurs</i> . — filtrable de la poule d'un type particulier : histiocyto-xantho-sarcome	217
— Etude biochimique et histochimique des — du crown-gall chez <i>Pelargonium zonale</i> . II.	602
<i>Torulose</i> . — spontanée chez le cobaye.	131
<i>Typhoïde</i> . Pouvoir protecteur antityphoïdique de sérums humains. Etude sur l'embryon de poulet.	239
<i>V. cholérique</i> . Voir <i>Brucelles</i> .	
<i>Virus</i> . Voir <i>Insectes</i> et aux différents virus.	

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 85

Notices nécrologiques.

† C. LEVADITI (1874-1953).	535
† E. LEMÉTAYER (1890-1953).	540
† M. MACHEBŒUF (1900-1953)	683

AÏTOFF (M ^{me} M.). — Action combinée <i>in vitro</i> de différents tuberculicides avec l'INH.	164
— SALAS (M ^{lle} A.) et GICQUEL (M.-J.). — Bactérie à Gram négatif, saprophyte, nettement pyrogène, isolée d'une eau distillée.	660
ATANASIU (P.). — A propos de la sensibilité de l'embryon de poulet au virus de la leucose aviaire.	586
— et BASSET (J.). — Action des pressions élevées sur le virus de la leucose et les cellules érythroblastiques. Action des mêmes pressions sur les cellules de la leucose lymphoïde de la souris.	500
— Voir SLIZEWICZ (P.).	
AUGIER (J.) et POCHON (J.). — Préparation d'un silico-gel dialysé stérile.	666
AVICE (C.). — Voir BAZIN (S.).	
BAHMANYAR (M.). — Voir BALTAZARD (M.).	
BALTAZARD (M.), SEYDIAN (B.), MOFIDI (Ch.), BAHMANYAR (M.) et POURNAKI (R.). — La résistance à la peste de certains rongeurs sauvages. I. Faits observés dans la nature.	411
BARJAC (H. DE) et POCHON (J.). — Titrage du pouvoir ammonifiant de la microflore des sols.	82
BARSKI (G.), ENDO (M.) et MONACI (V.). — Etude préliminaire des lésions de la poliomyélite en culture <i>in vitro</i> sur une souche de fibroblastes humains.	264
— SOUZA (P. DE), MONACI (V.), ENDO (M.) et LÉPINE (P.). — Résultats de la culture <i>in vitro</i> du virus poliomyélitique sur différentes souches cellulaires d'origine humaine.	576
BASSET (J.). — Voir ATANASIU (P.).	
— Voir VIGNAIS (P.).	

- BAZIN (S.), DELAUNAY (A.) et AVICE (C.). — Le glycogène intra-leucocytaire et ses variations au cours de la phagocytose. 774
- BÉGUET (M.). — Action de quelques antibiotiques sur divers types de *B. prodigiosus* issus de la même souche. 394
- BELJANSKI (M.). — Etude des acides nucléiques de souches bactériennes résistantes à la streptomycine et de souches de mêmes espèces, mais sensibles à l'antibiotique. 463
- BÉQUIGNON (R.), GUICHARD (A.) et VIALAT (C.). — Apparition de corps de Negri dans les lésions provoquées par le virus fixe sous l'action de la hyaluronidase. 263
- et VIALAT (C.). — Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1952. 308
- BERGER (R.). — Voir LATARJET (R.).
- BERNARD (J.). — Voir LAMBIN (S.).
- BEUMER-JOCHMANS (M^{me} M.-P.). — Etude de l'activité bactériostatique du bactériophage staphylococcique H. 483
- BINET (L.) et LEBLANC (M.). — Intoxication par l'amanite phalloïde. Réactions humérales. 139
- BOQUEL (M^{lle} G.). — Voir KAUFFMANN (J.).
- BORIES (G.). — Voir PELLISSIER (A.).
- BOYER (F.). — Voir CHABBERT (Y.).
- BRISOU (J.). — Voir MOUSTARDIER (G.).
- BRYGOO (E. R.). — Voir LAJUDIE (P. DE).
- Voir PRÉVOT (A.-R.).
- CANETTI (G.) et GRUMBACH (F.). — Diffusion de la streptomycine dans les lésions caséuses des tuberculeux pulmonaires. 380
- CAYRÉ (R. M.). — Voir VIALIER (J.).
- CHABBERT (Y.). — Technique simplifiée pour l'étude des associations d'antibiotiques. 122
- BOYER (F.) et DEHAVASSINE (M.). — Détermination de la sensibilité microbienne aux sulfamides par une méthode de disques séchés. 56
- CHALLUT (F.). — Voir THIVOLET (J.).
- CHAMBON (L.), FOURNIER (J.), LAJUDIE (P. DE) et DARRIEUSSECQ (J.). — La réaction d'hémagglutination dans la mélioïdose. . 530
- Voir LAJUDIE (P. DE).
- CHAUSSINAND (R.), VIETTE (M.), DEZEST (G.) et KRUG (O.). — Evolution de l'infection à b. de Stefansky chez le rat traité par l'INH. 398
- et TOUMANOFF (C.). — Les réactions cellulaires et la phagocytose chez les cobayes inoculés par voie intrapéritonéale avec des b. de Hansen vivants ou morts. 713
- CLAVELIN (C.). — Voir MALGRAS (J.).
- COSTIL (L.). — Voir TUBIANA (M.).
- CROISSANT (O.). — Voir LÉPINE (P.).
- DARRIEUSSECQ (J.). — Voir CHAMBON (L.).

- DECHAVASSINE (M.). — Voir CHABBERT (Y.).
- DEDONDER (R.) et NOBLESSE (M^{me}). — La glycolyse chez certaines bactéries du genre *Bacillus*. I. 71
— Mise en évidence de produits intermédiaires contenant du glucose dans la synthèse des lévanes par *B. subtilis*. 356
- DELAUNAY (A.). — Voir BAZIN (S.).
- DEOM (J.) et MORTELMANS (J.). — Influence de la concentration en peptone sur la culture et la sporulation de *B. anthracis*. 671
- DEVIGNAT (R.). — Voir LE MINOR (L.).
- DEZEST (G.). — Torulose spontanée chez le cobaye. 131
— Voir CHAUSSINAND (R.).
- DROUHET (E.). — Recherches sur la nutrition des Dermatophytes. III. 791
- DROUHET (M^{me} V.). — Voir TUBIANA (M.).
- DUFRENOY (J.). — Emploi du pinacyanol pour l'étude du mécanisme d'action d'antibiotiques 396
- EDLINGER (E.). — Voir NICOLLE (P.).
- ENDO (M.). — Voir BARSKI (G.).
- EYQUEM (A.), JOCHEM (E.), PODLIACHOUK (L.) et MILLOT (P.). — Etude de l'iso-hémagglutinine anti-T chez différentes espèces animales. 127
- EYQUEM (A.) et FINE (J.). — Essai d'obtention chez la chèvre, le mouton et le chien d'anticorps décelant les antigènes érythrocytaires humains M et N. 268
— — Les hémagglutinogènes et les hémagglutinines du sang des reptiles. II. Mise en évidence sur les globules rouges de certains animaux, de nouveaux antigènes hétérophiles à l'aide du sérum de *V. aspis*. 784
— et PODLIACHOUK (L.). — Groupes sanguins des Equidés. IV. Nouvelles observations sérologiques. 621
— Voir FINE (A.).
— Voir JOCHEM (E.).
— Voir SAMAILLE (J.).
- FAGRAEUS (A.) et GRABAR (P.). — Transfert à des lapins neufs de la capacité de production d'anticorps par des fragments de rate d'animaux immunisés. 34
- FAGUET (M.). — Propriétés inhibitrices de différents sucres sur la croissance de certains microorganismes. 408
- FAUCONNIER (B.). — Variations du pH du liquide allantoïque inoculé de virus grippal. 222
- FINE (J.) et EYQUEM (A.). — Les hémagglutinogènes et les hémagglutinines des sangs de vipère. I. *V. aspis*. 328
— Voir EYQUEM (A.).
- FLOCH (H.). — Etude comparative des genres *Moraxella*, *Achromobacter* et *Alcaligenes*. 675
- FOUACE (J.). — Relations entre la résistance à la pénicilline acquise

- in vitro* et la sensibilité aux phages chez les staphylocoques pathogènes. 390
- FOUACE (J.) et LUTZ (A.). — Type bactériophagique des staphylocoques pathogènes sécréteurs de pénicillinase. 387
- FOURNIER (J.). — Voir CHAMBON (L.).
- Voir LAJUDIE (P. DE).
- FRAPPIER (A.). — Voir PAVILANIS (V.).
- GALLAND (R.). — Voir GASTINEL (P.).
- GALLUT (J.). — Relations antigéniques entre vibriion cholérique et brucelles. II. La fraction antigénique thermostable commune. 261
- Voir GIRARD (G.).
- GARCIA MARTINEZ (A.). — Voir SANCHIS BAYARRI (V.).
- GASTINEL (P.), GALLAND (R.) et MAILLET (J.). — Du comportement des cobayes tuberculeux traités par l'isoniazide à l'égard de la sensibilisation tuberculinique et des phénomènes de surinfection. 287
- GICQUEL (M. J.). — Voir AÏTOFF (M^{me} M.).
- GIRARD (G.) et GALLUT (J.). — La phase de latence dans la croissance de *P. pestis* en bouillon. 372
- GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). — Pouvoir protecteur antityphoïdique de sérums humains. Etude sur l'embryon de poulet 239
- GRABAR (P.). — Voir FAGRAEUS (A.).
- GROULADE (P. et J.). — Etude par micro-électrophorèse sur papier du sérum de chiens normaux et pathologiques. 508
- GRUMBACH (F.). — Voir CANETTI (G.).
- GUICHARD (A.). — Voir BÉQUIGNON (R.).
- HAMON (Y.). — Voir NICOLLE (P.).
- HENRY-EVENO (J.). — Voir LEVADITI (C.).
- HUSSON (R.-A.) et KOERBER (R.). — Le vaccin contre la fièvre jaune préparé à l'Institut Pasteur de Dakar. 735
- JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). — Essais infructueux de vaccination contre la myxomatose des lapins par anavirus tissulaire. 133
- — et VIRAT (B.). — Essais de traitement de la myxomatose des lapins par quelques antibiotiques. 801
- JOCHEM (E.) et EYQUEM (A.). — Etude de l'iso-hémagglutinine anti-T chez différentes espèces animales. 527
- Voir EYQUEM (A.).
- KAUFFMANN (J.). — Méthode pratique de dosage microbiologique du phosphore dans les terres. 247
- et TOUSSAINT (P.). — La cellulolyse anaérobie du sol. 135
- et BOQUEL (M^{lle} G.). — Action du phosphore sur l'activité des germes nitrificateurs et dénitrificateurs du sol. 365
- KOERBER (R.). — Voir HUSSON (R.-A.).
- KRUG (O.). — Voir CHAUSSINAND (R.).

LAGRUE. — Voir SANDOR (G.).	
LAJUDIE (P. DE) et BRYGOO (R.). — Etude du pouvoir pathogène du bacille de Whitmore.	99
— FOURNIER (J.) et CHAMBON (L.). — L'appareil flagellaire du bacille de Whitmore.	112
— Voir CHAMBON (L.).	
LAMBIN (S.) et BERNARD (J.). — Etude de l'action des alcaloïdes sur les bactéries	757
LATARJET (R.), MORENNE (P.) et BERGER (R.). — Un appareil simple pour le dosage des rayonnements U.-V. émis par les lampes germicides.	174
LAVILLAUREIX (J.). — Voir TULASNE (R.).	
LEBLANC (M.). — Voir BINET (L.).	
LE BOT (M ^{lle} Y.). — Voir SANDOR (G.).	
LECOCQ (E.). — Voir LINZ (R.).	
— et LINZ (R.). — Un cas de résistance simultanée à la streptomycine et au bichlorure de mercure chez un staphylocoque.	383
LEMÉTAYER (E.). — Voir RAYNAUD (M.).	
LE MINOR (L.), DEVIGNAT (R.) et SCHOETTER (M.). — Un nouveau type de <i>Salmonella</i> : <i>S. garoli</i>	804
— Voir NÉEL (R.).	
LE MINOR (M ^{me} S.). — Voir GRABAR (M ^{me} J.).	
LÉPINE (P.), VAGO (C.) et CROISSANT (O.). — Mise en évidence au microscope électronique du virus de la polyédrie de <i>Plusia gamma</i> L.	170
— Voir BARSKI (G.).	
LEVADITI (C.). — Cultures cellulaires et virus poliomyélitique.	107
— et HENRY-EVENO (J.). — Antibiotiques et résistance microbienne	108
— VAISMAN (A.) et HENRY-EVENO (J.). — L'ilotycine, nouvel antibiotique élaboré par <i>Streptomyces erythreus</i>	148
LINZ (R.). — Mécanisme de l'action de la streptomycine. III. Le cas de <i>M. tuberculosis</i>	295
— et LECOCQ (E.). — Le mécanisme de l'action de la streptomycine. IV.	451
— Voir LECOCQ (E.).	
LUTZ (A.). — Voir FOUACE (J.).	
LUZZATI (D.). — Action des agents tensio-actifs sur le bacille de Koch : le Tween 80.	277
MACHEBOEUF (M.). — Voir PASQUIER (F.).	
— Voir VIGNAIS (P.).	
MAILLET (J.). — Voir GASTINEL (P.).	
MALGRAS (J.), MEYER (J.), SARTORY (B.) et CLAVELIN (C.). — Recherche et dosage de quelques facteurs de croissance dans un milieu à base d'hydrolysate de protéines.	664

- MANIGAULT (P.). — Etude biochimique et histochimique des tumeurs du crown-gall chez *Pelargonium zonale*. II. Phosphatases. 602
- MARCOVICH (H.). — Rapports entre la structure des acridines et leur activité en tant qu'agents inducteurs de mutants respiratoires chez la levure. 199
- Influence du pH sur l'action toxique et mutagène de l'eufflavine sur les levures. 443
- MAZUREK (C.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- MEYER (J.). — Voir MALGRAS (J.).
- MILLOT (P.). — Voir EYQUEM (A.).
- MINCK (R.). — Voir TULASNE (R.).
- MOFIDI (Ch.). — Voir BALTAZARD (M.).
- MONACI (V.). — Voir BARSKI (G.).
- MORENNE (P.). — Voir LATARJET (R.).
- MORTELMANS (J.). — Voir DEOM (J.).
- MOUSTARDIER (G.) et NICOLI (J.). — Contribution à l'étude de la flore microbienne de la paradentose 512
- MOUSTARDIER (G.), BRISOU (J.) et PERREY (M.). — Milieu de culture pour l'isolement des organismes L dans les uréthrites amicrobiennes à inclusions. 515
- — Transformation en bactéries normales d'organismes L isolés par culture à partir d'uréthrites amicrobiennes à inclusions. 520
- MUTSAARS (W.). — Rôle du phosphore dans le développement de la résistance du bactériophage aux rayons U.-V. 1
- NÉEL (R.), LE MINOR (L.) et KAWEH (M.). — Une nouvelle espèce de *Salmonella* isolée chez un corbeau : *S. hessarek*. 271
- NICOLI (J.). — Voir MOUSTARDIER (G.).
- NICOLLE (P.). — Voir PAVLATOU (M.).
- HAMON (Y.) et EDLINGER (E.). — Essai de subdivision de quelques lysotypes B Vi de *S. paratyphi* B. 706
- NOBLESSE (M^{me}). — Voir DEDONDER (R.).
- LOUDIN (J.). — L'analyse immuno-chimique du sérum humain et de ses fractions. I. 336
- PASQUIER (F.) et MACHEBOEUF (M.). — Etude de l'enlèvement par les acides aminés du cuivre combiné aux protéines. II. 803
- PAVILANIS (V.) et FRAPPIER (A.). — Etude de l'épidémie de poliomyélite à Saint-Augustin (P. Q. Canada). II. Evolution des anticorps neutralisant le virus type 2 à la suite de l'épidémie due au virus type 1. 690
- PAVLATOU (M.) et NICOLLE (P.). — Incidence des types biochimiques parmi les types bactériophagiques de *S. typhi*. 185
- PELLISSIER (A.). — Culture sur œuf embryonné et identification immunologique du virus de l'ictère épidémique d'A. E. F. 492
- Virus encéphalomyélitique du singe isolé à Brazzaville, d'un *Allenopithecus nigroviridis*. 593

PELLISSIER (A.). — Le virus « Cobaye E. R. », virus septicémique latent du cobaye à potentiel neurotrope.	724
PELLISSIER (A.) et BORIES (G.). — Une tumeur filtrable de la poule d'un type particulier : histiocyto-xantho-sarcome.	217
— et TRINQUIER (E.). — Isolement d'un virus encéphalomyélitique au cours d'une petite épidémie de « polio-myélite clinique » à Brazzaville. I. Etude expérimentale et épidémiologique.	316
PERREY (M.). — Voir MOUSTARDIER (G.).	
PIÉCHAUD (M.). — Sur un <i>Paracolobactrum</i> possédant l'antigène somatique du type provisoire <i>Sh. boydii</i> 11 et de <i>E. coli</i> 0 105.	496
POCHON (J.). — Voir AUGIER (J.).	
— Voir BARJAC (H. DE).	
PODLIACHOUK (L.). — Voir EYQUEM (A.).	
POURNAKI (R.). — Voir BALTAZARD (M.).	
PRÉVOT (A.-R.) et MAZUREK (C.). — Recherches sur la substance nucléaire de <i>Bifidobacterium bifidum</i> et d' <i>Actinobacterium cellulitis</i>	125
— — Etude de l'appareil nucléaire, de l'antibiogramme et du pouvoir pathogène d' <i>Actinobacterium meyeri</i>	258
— BRYGOO (E. R.) et SILLIOC (R.). — Action de la cortisone sur l'immunisation du lapin par l'anatoxine botulique.	255
— — Nouvelles recherches sur le botulisme et ses cinq types toxiniques.	544
QUERSIN-THIERY (M ^{me} L.). — Le sort de certains antigènes d' <i>E. coli</i> au cours de la lyse bactériophagique.	470
RAYNAUD (M.), TURPIN (A.) et LEMÉTAYER (E.). — Etude des anatoxines tétaniques concentrées.	376
RESENDE (M.). — Voir SANCHIS BAYARRI (V.).	
ROLLAND (M.). — Voir THIVOLET (J.).	
ROPARTZ (C.). — Voir SAMAILLE (J.).	
SABETAY (M ^{lle} Y.). — Voir SANDOR (G.).	
SALAS (M ^{lle} A.). — Voir AITOFF (M ^{me} M.).	
SAMAILLE (J.), ROPARTZ (C.) et EYQUEM (A.). — Anémie hémolytique expérimentale par hétéro-immunsérums chez le chien.	48
SANCHIS-BAYARRI (V.), GARCIA-MARTINEZ (A.) et RESENDE (M.). — La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à la pénicilline injectée par voie intracarotidienne.	119
SANDOR (G.) et LE BOT (M ^{lle} Y.). — La fiche réticulo-endothéliale. V.	281
— LAGRUE, LE BOT (M ^{lle} Y.) et SABETAY (M ^{lle} Y.). — La fiche réticulo-endothéliale. IV.	646
SARTORY (B.). — Voir MALGRAS (J.).	
SCHMID (E. E.). — Les types de salmonelles rencontrés par le Centre National des Salmonelles à Ceylan.	806
SCHOETTER (M.). — Voir LE MINOR (L.).	

- SERRE (H.). — Voir VIALIER (J.).
- SEYDIAN (B.). — Voir BALTAZARD (M.).
- SILLIOC (R.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- SIMERAY (A.). — Voir THIVOLET (J.).
- SLIZEWICZ (P.). — Sur la précision des mesures de constante de sédimentation. 503
- et ATANASIU (P.). — Ultracentrifugation et électrophorèse du sérum et du plasma de poules leucosiques. 505
- SOUZA (P. DE). — Voir BARSKI (G.).
- THIVOLET (J.), SIMERAY (A.), ROLLAND (M.) et CHALLUT (F.). — L'intra-dermo-réaction aux suspensions de tréponèmes formolées chez les syphilitiques et les sujets normaux. 23
- TIGAUD (J.). — Voir VIALIER (J.).
- TISON (F.). — Nouvelle technique d'inoculation au cobaye de produits surinfectés pour la recherche du B. K. Usage de l'aureomycine. 274
- TOUMANOFF (C.). — Description de quelques souches entomophytes de *B. cereus* ; leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'œuf. 90
- Voir CHAUSSINAND (R.).
- TOUSSAINT (P.). — Voir KAUFFMANN (J.).
- TUBIANA (M.), COSTIL (L.) et DROUHET (M^{me} V.). — Etudes sur la croissance du BCG en présence de phosphore radioactif. 402
- TULASNE (R.), MINCK (R.) et LAVILLAUREIX (J.). — Quelques précisions nouvelles sur le cycle L des bactéries. 525
- TURPIN (A.). — Voir RAYNAUD (M.).
- VAGO (C.). — Voir LÉPINE (P.).
- VAISMAN (A.). — Voir LEVADITI (C.).
- VALLÉE (A.). — Voir JACOTOT (J.).
- VIALAT (C.). — Voir BÉQUIGNON (R.).
- VIALIER (J.), CAYRÉ (R. M.) et SERRE (H.). — Sensibilité et vitalité des souches streptomycino-résistantes de *M. tuberculosis* vis-à-vis de l'isoniazide 116
- et TIGAUD (J.). — Réaction de Dubos et Middlebrook, test cytochimique de la virulence des Mycobactéries. 746
- VIETTE (M.). — Voir CHAUSSINAND (R.).
- VIGNAIS (P.). — Structure de l'acide ribonucléique. I. Fractionnement des acides ribonucléiques par l'acide acétique. 64
- II. Mode d'action de la ribonucléase. 230
- III. Quelques faits en faveur de liaisons de type secondaire dans l'A. R. N. 348
- VIGNAIS (P.), MACHEROEUF (M.) et BASSET (J.). — Comportement physicochimique de l'acide ribonucléique de levure soumis à l'action des hautes pressions. 629
- VIRAT (B.). — Voir JACOTOT (H.).

Le Gérant : G. MASSON.